

***A Metal-responsive transcription factor-1 és a
glutation peroxidáz család tagjait kódoló gének azonosítása és
expressziójának jellemzése pontyban***

DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

Ferencz Ágnes

Témavezető: Dr. Hermes Edit

Környezettudományi Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék

2010.

Szeged

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
2. BEVEZETÉS és CÉLKITŰZÉS	6
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
3.1. A ponty	9
3.2. A nehézfémek szerepe	9
3.2.1. A cink	10
3.2.2. A kadmium	10
3.2.3. Az arzén	11
3.2.4. Magyarországi természetes vizek nehézfém szennyezettsége	12
3.3. Az oxidatív stressz és az antioxidáns védelmi rendszer	12
3.3.1. Legfontosabb szabadgyökök	13
3.3.2. Az oxidatív stressz által okozott károsodások	14
3.3.3. Az antioxidáns védelmi rendszer	15
3.4. <i>Metal-responsive transcription factor</i>	16
3.4.1. Az MTF-1 fehérjék szerkezete	17
3.4.2. Az MTF-1 fehérjék szerepe	18
3.4.3. Az <i>mtf-1</i> gén szerkezete és expressziója	19
3.5. A glutation peroxidázok	21
3.5.1. A glutation	21
3.5.2. A glutation peroxidáz család	22
3.5.3. GPx1	23
3.5.3.1. A <i>gpx1</i> gén szerkezete és expressziója	24
3.5.4. GPx4	25
3.5.4.1. A <i>gpx4</i> gén szerkezete és expressziója	25
4. ANYAGOK és MÓDSZEREK	27
4.1. Kísérleti állatok és kezelési körülmények	27
4.2. Alkalmazott fém- és hidegkezelések	27
4.3. RNS preparálás fagyasztott mintákból	27
4.4. Northern hibridizáció	28
4.5. Reverz transzkripció (RT)	29

4.6. PCR amplifikáció	29
4.7. Primerek	29
4.8. Gélelektroforézis, fragment izolálás	31
4.9. Ligálás, transzformálás, plazmid DNS preparálás	31
4.10. Géldokumentáció, denzitometrálas	32
4.11. Filogenetikai analízis	32
4.12. Fehérjék kvantitatív meghatározása	33
4.13. Glutation mérési módszerek	33
4.13.1. A GSH szint meghatározása	33
4.13.2. A GSSG szint meghatározása	34
4.14. A lipidperoxidáció mérése	34
4.15. Enzimaktivitások mérése	35
4.15.1. A GPx aktivitás mérése	35
4.15.2. A GR aktivitás mérése	36
4.16. A DNS-károsodás vizsgálata	37
4.16.1. Genomiális DNS preparálás	37
4.16.2. DNS száltörés meghatározása fluorimetriás módszerrel	37
4.17. Statisztikai analízis	38
5. EREDMÉNYEINK	39
5.1. A <i>gpx4</i> specifikus cDNS-ek azonosítása pontyból	39
5.2. A <i>gpx1</i> specifikus cDNS azonosítása pontyból	42
5.3. A <i>gpx</i> család filogenetikai analízise	43
5.4. Az <i>mtf-1</i> specifikus cDNS-ek azonosítása pontyból	46
5.5. Ponty <i>mtf-1</i> génnek expressziója	50
5.5.1. Az <i>mtf-1</i> génnek szövetspecifikus expressziója	50
5.5.2. Cd ²⁺ -kezelés hatása az <i>mtf-1</i> génnek expressziójára	51
5.5.3. As ³⁺ -kezelés hatása az <i>mtf-1</i> génnek expressziójára	53
5.5.4. Hirtelen hőmérsékletváltozás hatása az <i>mtf-1</i> génnek expressziójára	54
5.6. Ponty <i>gpx</i> génnek expressziója	56
5.6.1. A <i>gpx</i> génnek szövetspecifikus expressziója	56
5.6.2. Cd ²⁺ -kezelés hatása a <i>gpx</i> génnek expressziójára	56

5.6.3. Hirtelen hőmérsékletváltozás hatása a <i>gpx</i> gének expressziójára	58
5.7. Cd ²⁺ -kezelés hatása a májszövetben	61
5.7.1. Májsejtek oxidatív károsodását jellemző paraméterek vizsgálata	61
5.7.2. Májsejtek glutation homeosztázisának vizsgálata	62
6. EREDMÉNYEINK ÖSSZEFOGLALÁSA és MEGBESZÉLÉSE	64
6.1. MTF-1	65
6.2. GPx	68
6.3. Cd ²⁺ -kezelés hatása a májban	70
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	73
8. IRODALOMJEGYZÉK	74
9. ÖSSZEFOGLALÓ	87
10. SUMMARY	92

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ARE:	<i>antioxidant responsive element</i>
C/EBP α :	<i>Ccaat-enhancer-binding protein alpha</i>
CAT:	kataláz
DEPC:	dietil-pirokarbonát
DTNB:	5,5-ditio-bis-nitrobenzoészav
EU:	enzimegység
G6PD:	glükóz-6-foszfát dehidrogenáz
GPx:	glutation peroxidáz
GR:	glutation reduktáz
GRE:	<i>glucocorticoid responsive element</i>
GSH:	redukált glutation
GSS:	glutation szintetáz
GSSG:	oxidált glutation
GST:	glutation-S-transzferáz
γ -GCS:	γ -glutamil-cisztein szintetáz
HSP:	hőszokk fehérje
LP:	lipidperoxidáció
MDA:	malondialdehid
MRE:	<i>metal responsive element</i>
MT:	metallothionein
MTF-1:	<i>metal-responsive transcription factor</i>
MTI:	<i>metal transcription inhibitor</i>
NES:	magi export szignál
NLS:	magi lokalizációs szignál
OD:	optikai denzitás
PIGF:	placenta növekedési faktor
ROS:	reaktív oxigén származékok (<i>reactive oxygene species</i>)
RT-PCR:	<i>reverse transcription-polymerase chain reaction</i>
Sec:	szelenocisztein
SOD:	szuperoxid dizmutáz
SP-1:	<i>signal protein-1</i>
STAT:	<i>signal transducers and activators of transcription protein</i>
SUMO:	sumoilációs hely
WHO:	Egészségügyi Világszervezet (<i>World Health Organization</i>)
ZnT1:	<i>Zinc-transporter protein-1</i>

2. BEVEZETÉS és CÉLKITŰZÉS

Környezetünk és ezen belül folyó- és állóvizeink szennyezése még napjainkban is komoly kérdéseket vet fel. A vízi élőlények közül a halak számára fokozott veszélyt jelent, hogy nem csak a táplálékkal együtt halmozhatják fel testükben az idegen anyagokat, de kopolyájukkal és bőrukkel állandó, szoros közelségben vannak a vízzel, és a vízben oldott anyagokkal. A külső hőmérséklet hirtelen változása, az ultraibolya sugárzás, a víz minősége és a tápanyaghoz való hozzáférés okozta stresszhatások mellett a halak számára további kihívást jelentenek az emberi tevékenységekből származó szennyeződések, mint például a hulladék, az olajszennyezés, a kemikáliák vagy a nehézfémek fokozott megjelenése vizeinkben.

A nehézfémek számos élettani folyamatot befolyásolhatnak negatív irányban. Többek között az élő szervezetbe jutva ionos kölcsönhatásba léphetnek a fehérjékkel, komplexet képezhetnek azok tiol- vagy amino-csoportjaival, amelyek ezáltal aspecifikusan gátlódnak. Emellett a nehézfémek reaktív oxigén szabadgyökök (ROS) és peroxidok fokozott keletkezését katalizálhatják, megváltoztathatják a sejtekben a redukált/oxidált glutationok arányát (GSH/GSSG).

A környezet stresszhatásaira adott gyors válaszadás képessége általános tulajdonsága az élőlényeknek. Ennek során számos védő és szabályzó fehérje expressziója és/vagy enzimaktivitása változik a szervezetben egy komplex védőrendszer keretein belül, amely nagyfokú homológiát mutat a különböző fajok között. Nehézfém terhelés esetén a fehérjék védelme érdekében a szervezetbe jutó fémionok egy részét szabad -SH csoporttal rendelkező molekulák, metallothioneinek (MT) és redukált glutationok (GSH) kötik meg (Wimmer és mtsi., 2005). A válaszreakciók során, többek között indukálódnak a GSH homeosztázisában szerepet játszó enzimek; a glutation szintetáz (GSS), a glutation peroxidázok (GPx), a glutation reduktáz (GR), és a glutation-S-transzferáz (GST). Illetve a felhalmozódó reaktív oxigén szabadgyököket elimináló enzimek; mint pl. a szuperoxid-dizmutáz (SOD), és a kataláz (CAT) (Hart és mtsi., 2001).

Kutatócsoportunk számos, a stresszválaszadásban szerepet játszó fehérjét illetve az őket kódoló géneket azonosított és karakterizált pontyban, ebben a gazdaságilag is nagy jelentőségű halfajban.

A dolgozatomban szereplő kísérletek egyrészében a sejtek Zn^{2+} homeosztázisának szabályzásában kulcsszerepet játszó *metal-responsive transcription factor-1* (*mtf-1*), másik részében az oxidatív stresszválaszadásban nagy jelentőségű *gpx* géncsalád tagjainak azonosítását és expressziójának vizsgálatát tűztük ki célul, különböző stresszhatásokat követően pontyban. A tervezett kísérletek rövid áttekintését az 1. táblázat mutatja.

A munkacsoportunkban végzett korábbi kísérletek nyomán többek között ismertté vált a ponty metallothioneineket és hősokk fehérjéket kódoló gének (*hsp*) expressziója májban, a méregtelenítés egyik fő szervében, illetve az agyban, melyre magas oxigén tartalma miatt fokozott veszélyt jelentenek az oxidatív stresszhatások. Az *mtf-1* és a *gpx* gének expresszióját ebben a két szervben terveztük vizsgálni, és emellett szeretnénk volna külön követni két különböző agyrégióban; a szaglólebenyben, és a kisagyban végbemenő változásokat. A fémek közül két erősen toxikus nehézfém, a Cd^{2+} és az As^{3+} ; a fizikai stresszhatások közül pedig a hirtelen hőmérséklet-változás hatásának vizsgálatát terveztük kísérleteink során.

A	kadmium				arzén		hidegsokk		
	máj	agy	szaglólebeny	kisagy	máj	agy	máj	szaglólebeny	kisagy
<i>mtf-1</i>									

B	kadmium		hidegsokk	
	máj	szaglólebeny	máj	szaglólebeny
<i>gpx</i>				

1. táblázat: Az *mtf-1* (A) és a *gpx* (B) gének expressziójának vizsgálatához tervezett kísérletek rövid áttekintése.

A felső sorokban a tervezett kísérletek, a második sorokban a vizsgálni kívánt szövet típusok felsorolása látható.

A génexpressziós változások követéséhez az RT-PCR módszerét kívántuk alkalmazni, génspecifikus primerek felhasználásával. Azonban mind az *mtf-1* gént, mind a *gpx* géneket eddig csak néhány halfajból azonosították, pontyból nem ált rendelkezésünkre szekvencia információ, így első feladatunk a vizsgálni kívánt gének izolálása volt pontyból.

Kísérleteink harmadik részében Cd^{2+} -kezelést követően kívántuk vizsgálni a sejtek károsodását jelző paramétereket, mint például a lipidperoxidációt, a redukált és oxidált GSH mennyiségének, illetve az egy- és kétszálú DNS-ek arányának változását, valamint a GPx és a GR enzimek aktivitásainak változásait.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. A ponty

A ponty (*Cyprinus carpio* L.) a *Cyprinidae* családba tartozó Eurázsiaiában őshonos, melegvíz kedvelő halfaj. Mindenevő, elsősorban az aljzatról táplálkozik. Magyarországon és Európában az elsődleges haszonhalak közé tartozik, az étkezési haltermelés legjelentősebb faja. Természetes vizeinkben is domináns, nemes hal.

A sugaras úszójú halak osztályában a 25-100 millió évvel ezelőtt lezajlott teljes genomduplikációt követően, kb. 10-16 millió évvel ezelőtt bizonyos fajoknál, mint a ponty és az aranyhal is, egy újabb részleges genom duplikáció zajlott le (Chrisman és mtsi., 1990; Larhammar és Risinger, 1994; David és mtsi., 2003; Zhang és mtsi., 2008). A *Cyprinidae* családra általában a $2n = 46-52$ diploid kromoszóma szám a jellemző, azonban triploidok és tetraploidok kialakulása is megfigyelhető közöttük. A hazai ponty egy természetes tetraploid faj; diploid kromoszómaszáma $2n = 102 \pm 2$ (Chrisman és mtsi., 1990).

3.2. A nehézfémek szerepe

A nehézfémek között vannak a szervezet számára esszenciális (mint például a vas, a cink vagy a réz) és toxikus nehézfémek (mint például a kadmium, a higany, az ólom vagy az arzén) is. Az utóbbiak már kis mennyiségben is jelentős sejt- és szövetkárosodást okozhatnak, de akkor is mérgezéssel kell számolnunk, ha az esszenciális fémekből túl nagy mennyiség kerül a szervezetbe. Napjainkban a környezetszennyezés növekedése miatt egyre több nehézfém jut a levegőbe, a vizekbe és a talajba is. A szervezetbe bejutott toxikus nehézfémek felezési ideje és ürülése rendkívül lassú folyamat; felhalmozódnak egyes szervekben, mint a májban, vesében, agyban, valamint a hajban, a bőrben és a csontokban is.

Részletesebben szólnék a cinkről, mely a dolgozatomban szereplő MTF-1 transzkripció faktor szerkezetének kialakításában nélkülözhetetlen szerepet játszó esszenciális fém; illetve a kísérleteink során használt két toxikus nehézfémről, a kadmiumról és az arzénról.

3.2.1. A cink

A cink (Zn^{2+}) az egyik alapvető nyomelem, amely valamennyi élő szervezetben megtalálható. Az emberben 2-4 g Zn^{2+} raktározódik, elsősorban az izmokban és a csontokban. Jelenleg több mint 400 Zn^{2+} -tartalmú fehérje ismert. A Zn^{2+} egyrészt a fehérjék natív szerkezetének kialakításában, másrészt enzimek esetében az aktív centrum működésében vehet részt. Fontos szerepe van a sejtsztódásban, a sejtmegújulásban, a Zn^{2+} -tartalmú transzkripciós faktorok révén a génexpresszió szabályozásában, és a sejtmembrán stabilizálásában. Hatékony a szabadgyökök semlegesítésében, erősíti az immunrendszert, nélkülözhetetlen a normális cukoranyagcseréhez és befolyásolja a sebgyógyulást (Andrews, 2001). A metallothioneinek, mivel $-\text{SH}$ csoportjaik révén nagymennyiségű fémion gyors megkötésére, tárolására, szállítására és szükség esetén leadására képesek, központi szerepet játszanak a Zn^{2+} homeosztázisában, nemcsak normál körülmények között, de Zn^{2+} -hiány és Zn^{2+} -terhelés esetén is (Andrews, 1990). Az MTF-1 faktor közreműködésével a Zn^{2+} jelentősen befolyásolja az MT-ek expresszióját is (Andrews, 2001).

3.2.2. A kadmium

A legnagyobb veszélyt jelentő nehézfémek egyike a kadmium (Cd^{2+}), mely a WHO (World Health Organization, 1992) és az IARC (International Agency for Research on Cancer) besorolása szerint az első nyolc karcinogén ágens közé tartozik. Szerepet játszhat a tüdő-, a here-, és a prosztatarák kialakulásában. A Cd^{2+} -ot sok helyen alkalmazzák az iparban; nikkel-kadmium akkumulátorok gyártásánál, festék-, és műanyag gyártás során, illetve a kohászatban. A dohány termesztése során a szennyezett talajból bekerül a növénybe, így jelentős mennyiségben fordul elő a cigarettafüstben is. Egyes felmérések szerint a Föld összlakosságának 7 %-ánál mutatható ki a szervezetben felhalmozódó Cd^{2+} -ra visszavezethető vesekárosodás (Jarup és mtsi., 1998).

A Cd^{2+} akut hatásai a májat és a vázizmokat károsítják. A krónikus expozíció a légutak és a vesék károsodása mellett gátolhatja az immunrendszer működését, és

károsíthatja a csontozatot (Jarup és mtsi., 1998; Jarup, 2003). Rendkívül hosszú, 15-20 éves felezési idővel rendelkezik. Gyengén genotoxikus és apoptotikus hatású. Sejtszinten a proliferizáció és a sejt differenciáció zavarát okozza; befolyásolja a génexpressziót és a szignál transzdukciót, fokozza az oxidatív stressz mértékét. Bár nem vesz részt a Fenton-típusú reakciókban és nem köt közvetlenül a DNS-hez (Waalkes és Poirier, 1984), de csökkenti az antioxidáns enzimek aktivitását (Waisberg és mtsi., 2003), indirekt hatásként fokozza a ROS (H_2O_2 , O_2^- , $\cdot\text{OH}$) képződését, a lipidperoxidációt és a DNS-károsodást (Waisberg és mtsi., 2003), ugyanakkor gátolja a DNS-t javító enzimek működését (McMurray és Tainer, 2003).

3.2.3. Az arzén

Az arzén (As) előfordulása a környezetben elsősorban a geológiai adottságok függvénye. Egyes helyeken, mint Kína, Tajvan, Chile, Argentína, Békés megye, veszélyes mennyiségben fordul elő az ivóvízben és a vízi élőlényekben inorganikus illetve szerves vegyületek formájában (WHO, 2001). A levegőben különösen a városok és az ipari területek közelében halmozódik fel, bár belélegzés útján adszorpciója kismértékű. Nagymennyiségben a bélrendszerből szívódik fel, majd a vérben hemoglobinhoz kötődve szállítódik. Felhalmozódása a hajban és a körmökben mutatható ki legkönnyebben. Akut terhelés esetén gasztrointesztinális tüneteket okoz, a hosszú idejű expozíció ér- és idegrendszeri zavarokhoz, végső soron halálhoz vezethet. Emellett karcinogén tulajdonságokkal is rendelkezik, növeli a tüdő-, a vese-, és a bőrrák, illetve más bőrbetegségek kialakulásának kockázatát.

A szervezetben egy oxidációs-redukciós lépés során arzenátból (As^{5+}) redukált GSH felhasználásával egy toxikusabb formává, arzenitté (As^{3+}) alakul át (Eller-Jessen és Crivello, 1998). Ismereteink szerint a MT-ek és a redukált GSH szabad $-\text{SH}$ csoportja is képes megkötni az As^{3+} -t (Toyama és mtsi., 2002).

3.2.4. Magyarországi természetes vizek nehézfém szennyezettsége

Magyarország természetes vízkészletének minősége nagymértékben függ a vízgyűjtő területeken elhelyezkedő szomszédos országokétól. A Duna és a Dráva mentén fekvő országok az elmúlt évtizedben korszerűsítették iparukat, ezért csökkent szennyvízkibocsátásuk. Másik nagy folyónk, a Tisza, vízgyűjtő területén található országokban pedig visszaesett a nehézipari termelés, illetve gazdasági okokból megszüntették a különösen nagy szennyezéssel járó termelést, így összességében ott is javult a helyzet. Elmondható, hogy a nehézfém (Cu, Zn, Ag, Hg, Pb, Cd) szennyezettség mértéke a magyarországi vizekben a megengedett határérték-szint alatt van, azonban nagyobb környezeti katasztrófák esetén az alap koncentrációk sokszorosai is mérhetőek.

A hazai vizekben gyakran előforduló szennyeződés az As, melynek forrása a vízáadó rétegekben keresendő. Az ÁNTSZ adatai szerint a szennyeződés leginkább a Dél-Alföldi régióra jellemző, egyes helyeken az Európai Unió határérték ötszöröse mutatható ki a vezetékes ivóvízben. Az As és más nehézfémek megbízható kimutatása nagyműszer igényű, lassú, és kizárólag csak laboratóriumban lehetséges.

3.3. Az oxidatív stressz és az antioxidáns védelmi rendszer

A reaktív oxigén szabadgyökök és intermedierek minden élő, aerob szervezetben megtalálhatók (Halliwell és Gutteridge, 1984). A szabadgyökök jellemző tulajdonsága, hogy igen reaktívak, mivel párosítatlan elektront tartalmaznak a külső elektronhéjukon. Szabadgyökök keletkezhetnek a szervezetben normál fizioológias körülmények között, bizonyos enzimek működése során (Halliwell, 1991), amikor az elektron-transzportláncból felszabaduló elektronok a molekuláris oxigénnel lépnek kölcsönhatásba (Fridovich, 1989). Másrészt a szabadgyököknek nélkülözhetetlen szerepe van a szignál transzdukciós jelátviteli utakban, az apoptózisban és a kórokozókkal szembeni nem specifikus védelemben is (Kowalski és mtsi., 2005). Azonban ha külső, exogén tényezők hatására, mint például a nehézfém-terhelés, az ionizáló-, UV-sugárzás vagy a magas hőmérséklet, a szabadgyökök száma felszaporodik, olyan gyökös láncreakciókat indíthatnak el a szervezetben, melyek a

lipidek peroxidációját (Gutteridge és Halliwell, 1990), a DNS szálak törését (Cooke és mtsi., 2003), és/vagy a fehérjék oxidatív módosulásait okozhatják (Berlett és Stadtman, 1997). A szervezet a megfelelő pro- és antioxidáns egyensúly kialakítására és fenntartására törekszik. Oxidatív stresszhatásról akkor beszélhetünk, ha ez az egyensúly felbomlik.

3.3.1. Legfontosabb szabadgyökök

A szuperoxid-anion ($O_2^{\cdot-}$) a leggyakrabban emlegetett ROS. Számos fiziológias folyamat során kialakulhat, mikor a felszabaduló elektronok molekuláris oxigénnel lépnek kölcsönhatásba, például az elektron-transzportlánc működése során, a fagociták aktiválódásakor, de kis mennyiségben az erek endothél rétege is termeli (Halliwell, 1991; Kowalski és mtsi., 2005). Károsíthatja a fehérvérsejteket, számos enzimet inaktiválhat, lipidperoxidációt indukálhat, és DNS lánctöréseket okozhat. Enzimatikusan a SOD képes átalakítani hidrogén-peroxiddá (H_2O_2).

Ha a szuperoxid-anion egy második elektront is felvesz, peroxid-ion (HO_2^{\cdot}) keletkezik belőle, mely fiziológias körülmények között azonnal oxidálódik és H_2O_2 -ot képez. A H_2O_2 nem rendelkezik párosítatlan elektronnal, de reaktivitása a szabadgyökökéhez hasonló. Károsíthatja a DNS-t, és lipidperoxidációt idézhet elő. A súlyos sejt-, és szövetkárosodások miatt gyulladásos folyamatok, szív- és érrendszeri betegségek kialakulásához vezethet (Stocks és Dormandy, 1972). Enzimatikusan a CAT és a GPx-ok képesek semlegesíteni.

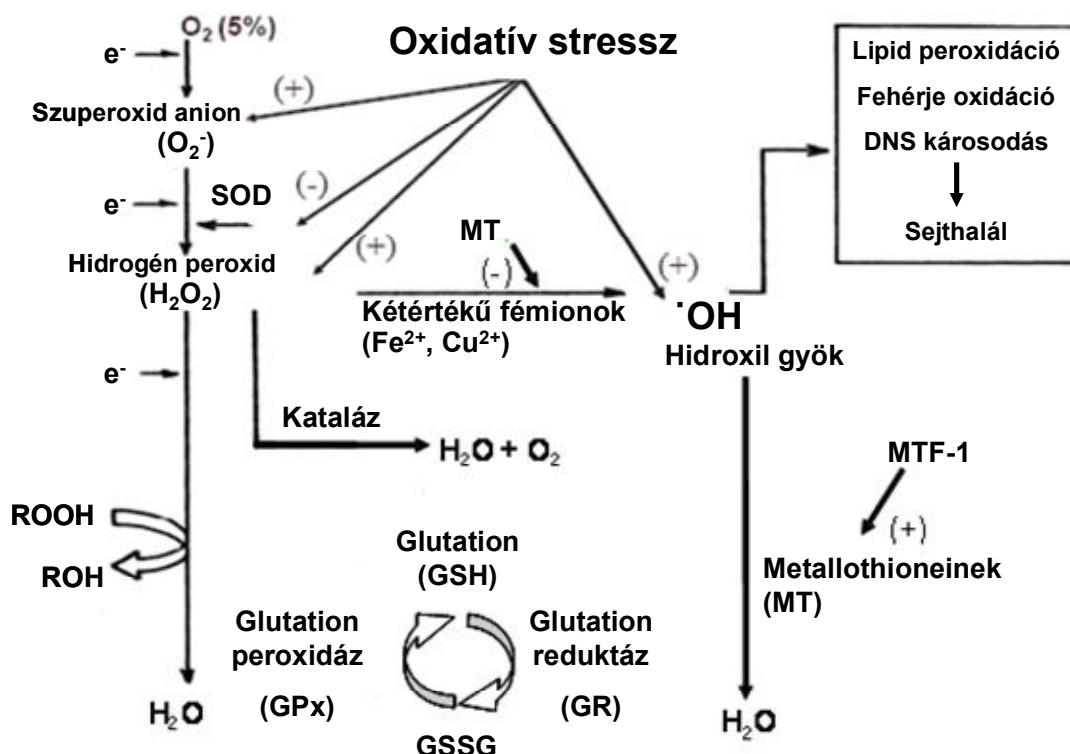
A hidroxil-gyök ($\cdot OH$) a legreaktívabb és legkárosabb oxigén szabadgyök. A H_2O_2 bomlása során keletkezik ionizáló sugárzás hatására, szerves gyökökkel való reagálás, vagy a Fenton-reakció során szabad kétértékű fémionok (Fe, Cu, Co, Ni, V) jelenlétében. Lipidperoxidációt, fehérje károsodást, DNS lánctörést és a bázisok módosulásait is okozhatja.

3.3.2. Az oxidatív stressz által okozott károsodások

A lipidek peroxidációja fiziológias körülmények között lassú folyamat, mivel az oxigén alapállapotban gyenge oxidálószer. Azonban ha valamilyen külső tényező (pl. sugárzás) hatására a lipidekből hidrogén elvonással lipid szabadgyök (R^\bullet) keletkezik, könnyen reakcióba lépnek a molekuláris oxigénnel. Láncreakciót indukálnak, mivel az aktív peroxi-gyök (ROO^\bullet) hidrogént von el egy szomszédos zsírsav oldalláncról. Peroxidációra főként a többszörösen telítetlen zsírsavláncok hajlamosak, azonban a peroxidáció kisebb mértékben károsítja a zsírsavak környezetében jelenlévő összes biomolekulát; a fehérjéket, nukleinsavakat és a szénhidrátokat is. A folyamat elsősorban a membránokat érinti, elvesztik fluiditásukat, integritásukat, és megnő a permeabilitásuk (Gutteridge és Halliwell, 1990). A láncreakció lezárása lánctörő antioxidáns molekulák (pl. GSH, E-vitamin) segítségével történhet.

A fehérjék oxidatív károsodását gyakran a H_2O_2 indukálja. Jelenlétében kialakulhatnak fehérje-fehérje keresztkötések, fragmentálódások, reaktív karbonil származékok, és oxidálódhatnak az aminosav oldalláncok is (Berlett és Stadtman, 1997).

Hasonlóan a fehérjékhez, a DNS károsodás egyik jelentős forrása a fokozott ROS felhalmozódás. A szabad gyökök hatására számos bázis-modifikáció történhet, mint például a timin-glikol, vagy a 8-oxoguanin kialakulása. *Repair* rendszerek hiányában a lánc károsodása fragmentálódáshoz, bázisvesztéshez és száltöréshez; a DNS mutációk számának növekedéséhez, végül apoptózishoz vezethet (Cooke és mtsi., 2003).



1. ábra: A reaktív oxigén szabadgyökök képződésének és az antioxidáns védelmi rendszer tagjainak összefoglaló ábrája.

Az ábrán az oxidatív stressz során felszabaduló szabadgyökök, a szabadgyökök által indukált láncreakciók és lehetséges sejtkárosodások láthatóak. Emellett szerepelnek még a sejt antioxidáns enzimjei, az általuk katalizált reakciók, valamint a fém- és szabadgyök kötő MT-ek (Konturek és mtsi., 2007. évi cikke nyomán).

3.3.3. Az antioxidáns védelmi rendszer

Az oxidatív stressz kivédésére a szervezetben háromszintű antioxidáns védelmi rendszer alakult ki. Az első szintet az antioxidáns enzimek (SOD, CAT, GST, GPx) és a fémkötő fehérjék (MT-ek, ferritin) képviselik (McCord és Fridovich, 1969; Kono és Fridovich, 1982), amelyek vagy gyök-kioltó reakciókat katalizálnak, vagy önmaguk képesek a ROS semlegesítésére, így a láncreakciók iniciációjának, vagyis a további szabadgyökök képződésének megelőzésére.

A második védelmi vonalhoz olyan kis molekulású antioxidánsok tartoznak, amelyek anélkül képesek megszakítani a gyökös láncreakciókat, hogy önmaguk reaktív

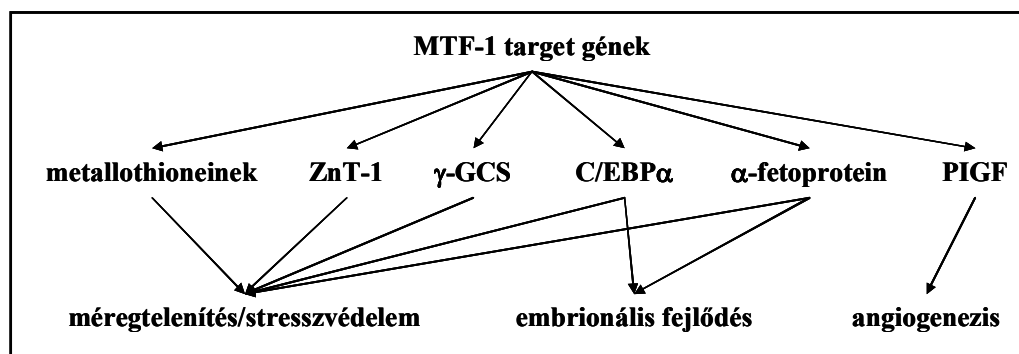
gyökké alakulnának. Zsíroldékony antioxidánsok például az A- és E-vitamin, a karotinoidok, vízóldékonyak a C-vitamin, a húgysav és a GSH (Buettner, 1993).

A harmadik védelmi vonal feladata a már károsodott makromolekulák helyreállítása vagy eltávolítása. Közéjük tartoznak a Hsp fehérjék, a lipázok, a proteázok, a DNS-*repair* enzimek és a GR is.

3.4. *Metal-responsive transcription factor*

Az MTF-1 egy 80 kDa-os, 6 darab Zn-finger motívumot tartalmazó fehérje, melyet a MT-ek promóterében több kópiában megtalálható *metal responsive element* (MRE) szekvenciákhoz kötődő fehérjeként azonosítottak először (Westin és Schaffner, 1988). Ismereteink szerint az MTF-1 nélkülözhetetlen pozitív regulátora a MT gének alap és fémindukált expressziójának is (Heuchel és mtsi., 1994; Palmiter, 1994; Samson és Gedamu, 1998; Andrews, 2001).

Fiziológias körülmények között az MTF-1 a citoplazmában található, Zn-szenzor fehérje. Stresszhatásra (nehézfém-kezelés, hőmérsékleti stressz, oxidatív ágensek, vagy alacsony extracelluláris pH) a sejtmagba transzlokálódik, ahol az MRE szekvenciákhoz kapcsolódva mai ismereteink szerint 28, a stresszválaszadásban szerepet játszó gén transzkripcióját fokozhatja (Andrews, 2001; Chung és mtsi., 2005). Legismertebb target génjei közé tartoznak speciális fémexport pumpák génjei, mint a Zn-transzporter-1 (ZnT1) (Langmade és mtsi., 2000) és nagy affinitással rendelkező fémkötő fehérjék génjei, mint a MT-ek. Az embriogenezisben jelentős α -fetoprotein (Mizjewski és mtsi., 1997), a placenta-növekedési faktor (PIGF) (Green és mtsi., 2001); valamint a GSH szintézis első lépéséért felelős γ -glutamil-cisztein szintetáz is (γ -GCS) (Günes és mtsi., 1998) (2. ábra). Emellett az MTF-1-nek fontos szerepet tulajdonítanak a tumor angiogenezisben, a drogrezisztenciában (Radtko és mtsi., 1993; Heuchel és mtsi., 1994); és a vérnyomás szabályozásában is (Lichtlen és Schaffner, 2001). Az *mtf-1* null-mutáns egér embriók 14 naposan elpusztulnak májkárosodás következtében; elsősorban a γ -GCS szintézis hiánya miatt (Lichtlen és Schaffner, 2001).



2. ábra: Az MTF-1 fehérje hat legismertebb target génje és azok szervezetben betöltött szerepe (Lichtlen és Schaffner, 2001. évi cikke nyomán)

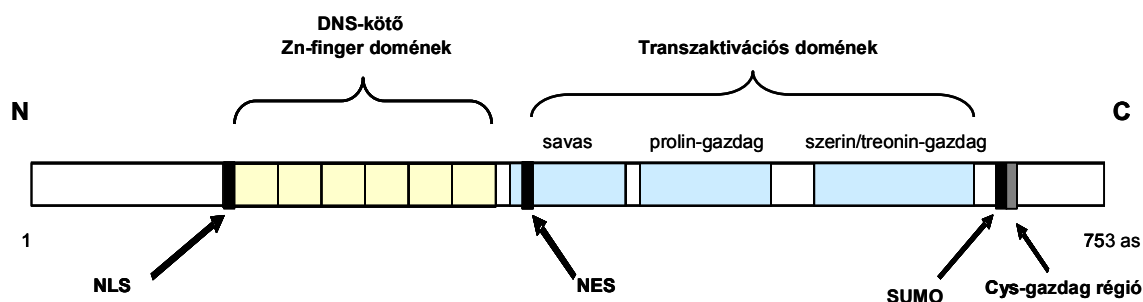
3.4.1. Az MTF-1 fehérjék szerkezete

Az MTF-1 fehérje szerkezete evolúciósan konzervált, két jól elkülöníthető részből áll. A fehérje N-terminálisa a DNS-kötő domén, amely 6 darab Cys₂-His₂ típusú Zn-finger motívumot tartalmaz. A hat különböző Zn-finger közül négy (F1-F4) specifikusan, nagy affinitással kapcsolódik az MRE régió *core* szekvenciájához, a másik két Zn-finger (F5, F6) pedig az MRE régió GC-gazdag szekvenciájához kötődik (Chen és mtsi., 1999; Koizumi és mtsi., 1999) (3. ábra).

A fehérje C-terminális részén található a transzaktivációs domén, ami három szubdomént tartalmaz; a savas aminosavakban gazdag, a prolin-gazdag, és a szerin/treonin-gazdag régiót. Ezek funkciója kevésbé ismert, de az MTF-1 és a transzkripcionális apparátus közötti kölcsönhatásokban lehet szerepük (Radtko és mtsi., 1995). A transzaktivációs doménjei nélkül az MTF-1 fehérje bár képes transzlokálódni a sejtmagba és rendelkezik DNS-kötő kapacitással, de nem képes aktiválni a target génjei expresszióját.

További jellemző motívumok is azonosíthatók az MTF-1 fehérjéken; tartalmaz egy magi lokalizációs szignált (NLS); és egy rövid, leucin-gazdag szekvenciát, a magi export szignált (NES) (Saydam és mtsi., 2001). Továbbá a C-terminális részén egy sumolizációs-hely (*putative sumoylation motif*) található, és egy újabb, ciszteinben gazdag szabályzó hely (Cys-cluster) (3. ábra). *In vivo* kísérletek alapján ez utóbbi

közrejátszhat a transzkripció aktivációban nehézfém-terhelés esetén (Saydam és mtsi., 2001; Chen és mtsi., 2004).



3. ábra: Az MTF-1 fehérjék sematikus szerkezete.

A sematikus ábrán színes téglalapok jelölik a DNS-kötésben és a target gének transzaktivációjában szerepet játszó DNS-kötő (sárga) és transzaktivációs domének (világoskék) helyét a zebradánio *mtf-1* szekvenciája alapján bejelölve. Fekete illetve szürke téglalapok mutatják az *mtf-1*-re jellemző motívumok (NLS, NES, sumolizációs hely, Cys-gazdag régió) helyét (Balamurugan és mtsi., 2004. évi cikke nyomán).

3.4.2. Az MTF-1 fehérjék szerepe

Az MTF-1 fehérjék központi szerepet játszanak a sejtek Zn^{2+} -homeosztázisának fenntartásában. Fiziológias körülmények között, amikor a sejt szabad Zn^{2+} -tartalma alacsony, az apo-MTF-1 fehérjék 90%-a nem köt Zn^{2+} -t, a citoplazmában lokalizálódik, és egy Zn^{2+} -érzékeny inhibitor (*Metal transcription inhibitor*, MTI) kapcsolódik hozzá (Saydam és mtsi., 2001). Oxidatív stressz vagy nehézfémterhelés esetén a MT-ek által alapállapotban kötött Zn^{2+} felszabadul, a sejt szabad Zn^{2+} -tartalma megnő, az MTF-1 Zn-finger doménjei telítődnek. Ezáltal kialakul az MTF-1 fehérje aktív térszerkezete, foszforilálódik, majd a sejtmagba transzlokálódik, ahol a target génjei promóterében található MRE szekvenciákhoz kötődve indukálja azok expresszióját (Smirnova és mtsi., 2000; Saydam és mtsi., 2001) (4. ábra). Az újonnan szintetizálódó fém-export

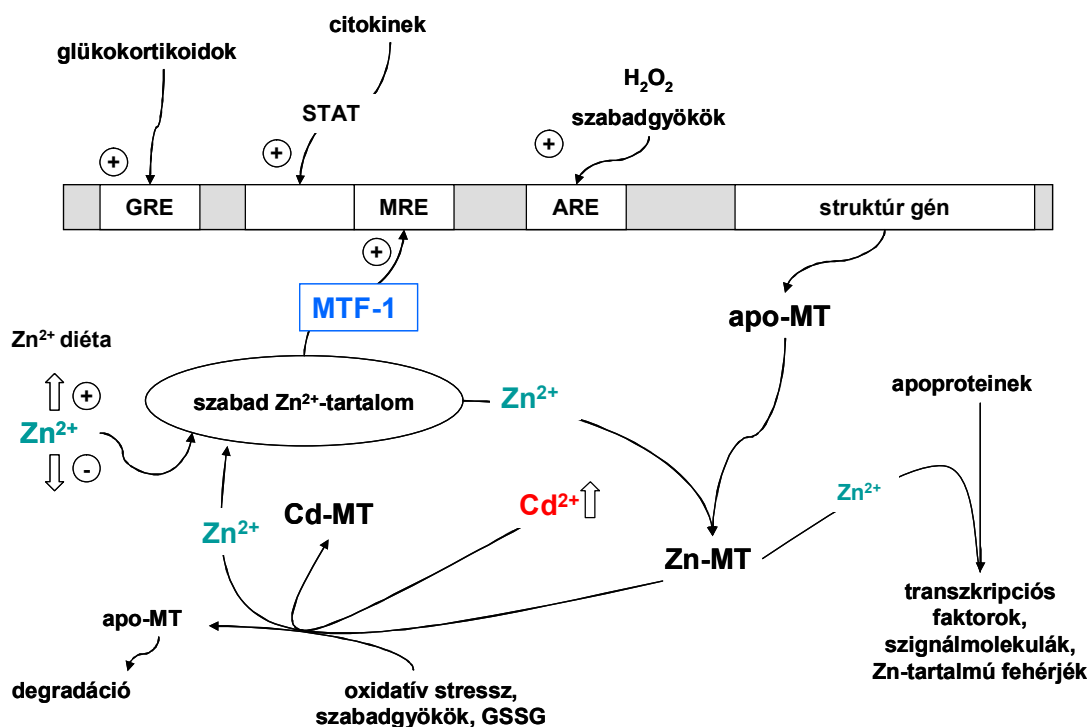
pumpák és MT-ek célja helyreállítani a sejt Zn^{2+} -homeosztázisát (Giedroc és mtsi., 2001).

3.4.3. Az *mtf-1* gén szerkezete és expressziója

Bár pontyból eddig nem volt ismert az *mtf-1* gén, de magasabbrendű gerincesekből és néhány halfajból már azonosították a fehérjét kódoló gén teljes szekvenciáját; halak közül elsőként japán gömbhalból (*Takifugu rubripes*, Auf der Maur és mtsi., 1999), majd szivárványos pisztrángból (*Oncorhynchus mykiss*, Dalton és mtsi., 2000) és zebradánióból (*Danio rerio*, Chen és mtsi., 2002).

Az *mtf-1* genomiális DNS szekvenciát egyetlen hal esetében (japán gömbhal) azonosították eddig (Auf der Maur és mtsi., 1999). A kódoló régió 11 exonon helyezkedik el, a promóter régiójában nem található sem TATA-box, sem a fémindukció közvetítéséért felelős MRE kötőhely (Auf der Maur és mtsi., 1999; 2000).

Kísérleteink kezdetén az *mtf-1* gén expressziójáról csak kevés információ állt a rendelkezésünkre. Különböző egér szövetekben és sejtvonalakban Northern hibridizációval nem tudtak különbséget kimutatni a mRNS mennyiségekben (Auf der Maur és mtsi., 2000). *In vitro* vizsgálatok szerint az *mtf-1* expresszióját sem a nehézfém (Zn^{2+} , Cd^{2+}), sem H_2O_2 -kezelés nem befolyásolja szignifikánsan (Otsuka és mtsi., 2000). Illetve RT-PCR vizsgálatok során zebradánió embriók különböző fejlődési stádiumaiban sem találtak szignifikáns expressziós különbségeket a különböző szövetekben (Chen és mtsi., 2002).



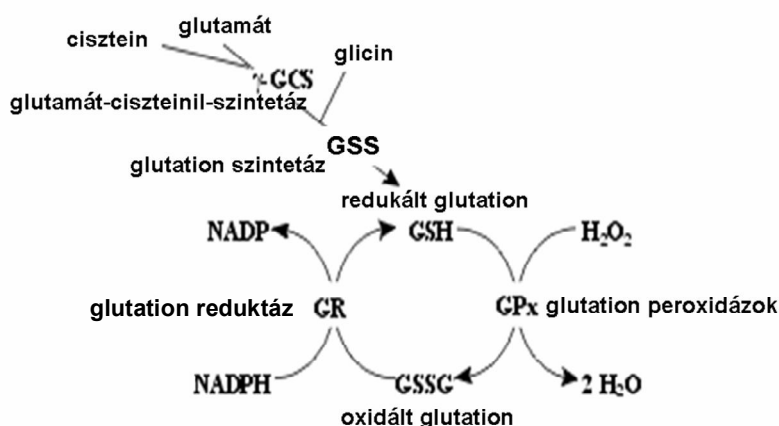
4. ábra: A MT és az MTF-1 fehérjék szerepe a sejtek Zn^{2+} -háztartásában.

A MT-ek promóterrégiójának főbb elemei, a *glucocorticoid responsive element* (GRE), a *metal responsive element* (MRE) és az *antioxidant responsive element* (ARE). A szintetizálódó MT fehérjék Zn^{2+} -et kötnek, ezt azonban könnyen átadják más Zn^{2+} -tartalmú fehérjéknek, illetve leadják oxidatív stresszhelyzetben, vagy Cd^{2+} -terhelés esetén. A sejt szabad Zn^{2+} -tartalma befolyásolja az MTF-1 fehérjék DNS-kötő aktivitását. Az MTF-1 fehérje a MT-ek expressziójának legfontosabb szabályzó faktora fiziológias és stressz-indukált körülmények között is (Davis és Cousins, 2000. évi cikke nyomán).

3.5. A glutation peroxidázok

3.5.1. A glutation

Cd^{2+} -terhelés esetén az MTF-1/MT útvonal mellett a szervezet másik nagy védekező rendszerének tagjai a GSH és a hozzá kapcsolódó enzimek (Wimmer és mtsi., 2005). A GSH az egyik legfontosabb, mindössze három aminosavból (γ -Glu-Cys-Gly) álló, vízzoldékony antioxidáns molekula. Redukált formája (GSH) egy szabad -SH csoporttal rendelkezik, mely nehézfém terhelés esetén fémionokat köt, oxidatív stressz esetén könnyebben oxidálódik, mint a sejt fehérjei, így a stresszhatások elleni védekező reakciók egyik fontos komponense. Maga is gyökfogó tulajdonságú, de emellett részt vesz az aszkorbinsav és rajta keresztül az E-vitamin regenerálásában, a GPx-ok koszubsztrátjaként a H_2O_2 és a lipid-peroxidok redukálásában, illetve a GST koszubsztrátjaként a xenobiotikumok semlegesítésében.



5. ábra: A sejtek glutation homeosztázisában részvevő enzimek és feladataik.

A GSH szintézisének első lépése a Glu és a Cys közti kötés kialakítása, amit a γ -GCS enzim végez. A második lépés a Gly hozzáépítése a dipeptidhez, a GSS enzim által. A GPx-ok a GSH-t koszubsztrátként használják a H_2O_2 , és egyes szerves peroxid származékok redukálásához, ami során GSSG keletkezik. A GSSG redukálását a GR végzi, NADPH felhasználásával.

A GSH szintézise két lépésben, két ATP felhasználásával, a γ -GCS és a GSS enzim segítségével történik (5. ábra). A γ -GCS transzkripcióját a MT-hez hasonlóan, elsősorban az MTF-1 faktor szabályozza (Günes és mtsi., 1998) (2. ábra). Az oxidált

GSSG felhalmozódása citotoxikus, redukálását, és így újbóli felhasználhatóságát a GR, egy NADPH függő enzim biztosítja (5. ábra). A szervezet redox rendszerének épségéhez, mind a GSS, mind a GR enzimekre szükség van, hiányuk súlyos kórképhez vezet.

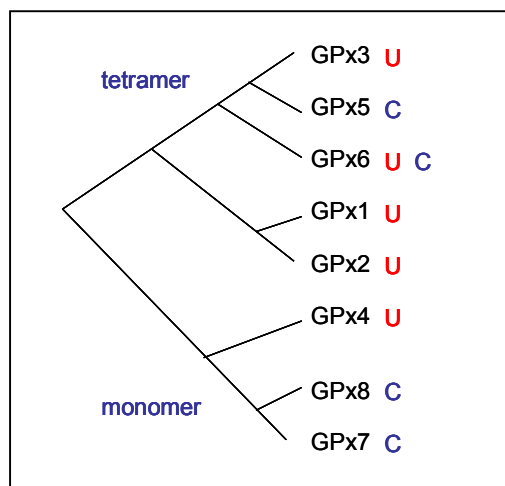
3.5.2. A glutation peroxidáz család

A GPx enzimek az antioxidáns védelmi rendszer nélkülözhetetlen elemei. A család egyes tagjai a membránok védelmét biztosítják, mások a citoszol és a sejtorganellumok oxidatív károsodása ellen hatnak. Jelentős szerepet töltenek be a ROS káros hatásaival szembeni védekezésben, képesek a SOD működése során keletkező H_2O_2 -t vízzé alakítani, GSH oxidációja mellett (Imai és Nakagawa, 2003) (1. és 5. ábra). A GPx enzimek egyaránt megtalálhatók a sejtmagban, a mitokondriumokban és a citoszolban is, ezzel szemben a hasonló funkciót betöltő CAT elsősorban a peroxisómákban fordul elő (Flohé és mtsi., 1989).

Emlősökben eddig nyolc különféle, a GPx családba tartozó fehérjét azonosítottak; elnevezésük az őket kódoló gének azonosításának sorrendjében történt. A család első tagját a klasszikus vagy celluláris GPx1-t, vörösvértestből azonosították (cGPx; Mills és mtsi., 1957). A gasztrointestinális GPx2-nek (GSHPx-GI; Chu és mtsi., 1993) specifikus aktivitása van a táplálékkal felvett szerves hidroperoxidokkal szemben. Az extracelluláris GPx3 (pGPx; Takahashi és mtsi., 1990) egy glikoprotein, legnagyobb mértékben a vesében szintetizálódik, de szerepét a vérben keringve tölti be. A foszfolipid hidroperoxid glutation peroxidáz, GPx4 (PhGPx; Ursini és mtsi., 1982) a család egyetlen olyan tagja, mely közvetlenül képes a membránokhoz kapcsolódni, és kosubsztrátként redukált tiolokat is felhasznál a GSH mellett. A mellékhere-specifikus GPx5 (eGPx; Ghyselinck és mtsi., 1989) a család elsőként felfedezett olyan tagja, melyben cisztein található a szelenocisztein helyén. Az *olfactory*-specifikus GPx6 (OMP; Dear és mtsi., 1991), a szaglólebenszítéiumában expresszálódik, és érdekessége, hogy míg emberben szelenocisztein, rágszálókban cisztein található az aktív centrumában. Aktív centrumában szintén cisztein tartalmú a GPx7 (Utomo és mtsi., 2004), melyet emlős mellrák sejtekből izoláltak, és szubsztrátjai a GPx4-hez hasonlóan foszfolipid hidroperoxidok, valamint a legújabban felfedezett GPx8 (Toppo

és mtsi., 2008), amely bár a szerkezete alapján a GPx-ok családjába tartozik, de GSH helyett thioredoxint használ elektron donorként.

Kutatásaink kezdetén pontyan egyetlen *gpx* gén sem volt ismert. Egyéb halfajokban azonban már azonosították a család néhány tagját: *gpx1*, *gpx4* szekvenciák több, *gpx3* és *gpx7* szekvenciák 1-1 halfajból voltak ismertek.



6. ábra: A glutathione peroxidáz család filogenetikai törzsfájának sematikus rajza.

Az utolsó oszlopban jelölve, hogy az enzim aktív centrumában szelenocisztein (U) vagy cisztein (C) található (Toppo és mtsi., 2008. évi cikke nyomán).

3.5.3. GPx1

A GPx1 felfedezése Mills (1957) nevéhez fűződik, aki vörösvértestek oxidatív hemolízisének vizsgálata során írta le ezt az enzimet. Az aktív enzim négy alegységből áll, és minden alegység aktív centrumában egy szelenocisztein (Sec) aminosav található (Maiorino és mtsi., 1998). Széles szubsztrát-specifitással rendelkezik; a SOD enzimek működése során keletkező H_2O_2 mellett egyes szerves hidroperoxidokat is képes alkohollá redukálni, kizárólag redukált GSH-t használva kosubsztrátként.

A GPx1 fehérje bizonyos régióinak szerkezete rendkívül konzervált. Ilyen az enzim aktivitásában központi szerepet betöltő katalitikus tetrád: ^{45}Sec , ^{87}Glu , ^{165}Trp , és ^{166}Asn és a tetramerizációért felelős 136-152-es aminosavak közötti régió. A Sec a fehérjeszintézis során épül be, amit a mRNS 3' nemkódoló régiójában kialakuló másodlagos struktúra, egy *stem-loop* tesz lehetővé (Imai és mtsi., 1995).

3.5.3.1. A *gpx1* gén szerkezete és expressziója

Emlősökben a *gpx1* gén egy kópiában található meg (Ho és Howard, 1992). Promóter régiójában azonosítottak egy TATA-boxot, egy CAAT-boxot, két *signal protein-1* (SP-1) kötőhelyet és patkány esetében egy AP-2 kötőhelyet is. A *gpx1* gén kifejeződésében jelentős különbségek mérhetők az egyes szervek és szövetek között, amit a szervezet változó hormonszintje és az életkor mellett a legnagyobb mértékben a táplálék szelén tartalma befolyásol.

A szelénről csak 1957-ben bizonyosodott be, hogy esszenciális, nem-fémes eleme a szervezetnek (Stapleton, 2000). A természetben négyféle oxidációs állapotban fordul elő, a növények a talajból felvéve szelenát formájában építik be az aminosavaikba. A 21. aminosav, a Sec, a ciszteinre jellemző -SH csoport helyett szelént tartalmaz. A fehérjékbe a transzláció során épül be, megfelelő körülmények között. Számos fehérje aktív centrumában megtalálható: GPx-ok, szelenoprotein P és W, thioredoxin reduktáz, szelenofoszfát szintetáz (Rotruck és mtsi., 1973; Gu és mtsi., 2000; Mostert és mtsi., 2000). Szelénhiánnyal összefüggésbe hozható betegségek: egyes szív és érrendszeri problémák, a Down-szindróma, Alzheimer-kór, és az AIDS (Virtamo és mtsi., 1985; Vinceti és mtsi., 2000).

A *gpx1* gén(ek) teljes kódoló szekvenciáját publikálták zebradánióból (*Danio rerio*, Thisse és mtsi., 2003) és fehér busából (*Hypophthalmichthys molitrix*, Li és mtsi., 2007), emellett a GenBank-ban megtalálható tonhalból (*Thunnus maccoyii*); és amurból (*Ctenopharyngodon idella*). Ismert még a kódoló szekvencia 3' régiója (376 nukleotid) aranyhalból (*Carassius auratus*, Choi és mtsi., 2007).

A *gpx1* gén expressziójára vonatkozó információk azonban csak néhány fajból álltak rendelkezésünkre; kezeletlen fehér busa szöveteit vizsgálva, májban mérték a legmagasabb *gpx1* mRNS szintet, de a zsírszövetben, az izomban és az agyban is detektálható mennyiségben volt jelen (Li és mtsi., 2007). Az aranyhalban, viszont normál állapotban csak a májban és vesében mérhető a *gpx1* mRNS mennyisége, agyban és a bélszövetben nem. A zebradánió esetében kétféle *gpx1* mRNS-t izoláltak embrionális szövetekből (*gpx1a* és *gpx1b*), expressziós mintázatuk azonban nem ismert (Thisse és mtsi., 2003).

3.5.4. GPx4

A GPx4-et először 1982-ben azonosították Ursini és munkatársai (1982), mint egy peroxidációt gátló fehérjét. Eltérően a klasszikus GPx-októl, amelyek tetramerek (GPx1, 2, 3, 5, 6), a GPx4 egy monomer felépítésű enzim (Ursini és mtsi., 1985), ami nemcsak a H₂O₂-ot képes semlegesíteni, hanem egyes lipid-hidroperoxidokat is, mint például a koleszterint és a koleszterol-észtereket. Ezen kívül a GPx4 az egyetlen olyan GPx, amely közvetlenül képes kapcsolódni a membránhoz, és csökkenteni a redukált foszfolipid hidroperoxidok számát (Maiorino és mtsi., 1991). Ehhez koszubsztrátként nem csak GSH-t, hanem egyéb tiolokat is képes felhasználni. A GPx4 fehérje elsődleges szerepet játszik a spermiumokérésében és a sejtek oxidatív stressz elleni védelmében, a *gpx4* nullmutáns egérembriók az embrionális fejlődés 7,5. napján elpusztulnak (Yant és mtsi., 2003).

A GPx4 enzimek hasonlósága a többi GPx-hoz nagyon kicsi, emlősnél mindössze 30-40% aminosav szinten (Imai és mtsi., 1995), és elsősorban az aktív centrum kialakításában résztvevő aminosavakra: a katalitikus tetrádra és a környező aminosavakra korlátozódik (Schuckelt és mtsi., 1991; Tosatto és mtsi., 2008). Mivel monomer, a GPx4-ből hiányoznak a tetramerizációért felelős aminosavak (136-152-es aminosavak közötti régió).

3.5.4.1. A *gpx4* gén szerkezete és expressziója

Magasabb rendű gerincesekben a *gpx4* gén egyetlen kópiában található meg a genomban (Kelner és Montoya, 1998). A fehérjét kódoló szekvencia rágcsálókban hét exonból épül fel (Arai és mtsi., 1996). A vizsgálatok szerint patkányban az egyetlen *gpx4* gén több transzlációs start hellyel rendelkezik (Pushpa-Rekha és mtsi., 1995), melyek differenciált használata során három különböző méretű fehérjetermék keletkezik. Elsődlegesen a tesztiszben fordul elő az a 197 aminosavból álló 23 kDa-os forma (L-PhGPx; mGPx4), amely az N-terminális részén tartalmaz egy mitokondriális targeting szignált (Arai és mtsi., 1996; 1999). Szomatikus sejtekben szinte kizárólag a 170 aminosavból álló 20 kDa-os fehérje szintetizálódik (S-PhGPx; cGPx4), mely

citoszólikus vagy membránhoz kötött formában található meg (Pushpa-Rekha és mtsi., 1995). Patkány spermium sejtek sejtmagjából izoláltak egy harmadik, 34 kDa-os GPx4 enzimet is (SnGPx), ami egy alternatív első exont tartalmazó mRNS-ről szintetizálódhat szövetfüggően, és a spermiumok érésében játszik szerepet (Pfeifer és mtsi., 2001; Maiorino és mtsi., 2003).

A *gpx4* gén promóter régiójában, nem találhatók sem a TATA-, sem a CAAT-boxhoz hasonló szekvenciák. Az ismert fehérjekötő régiók közül az Sp1 és a *nuclear factor-Y* (NF-Y) szekvenciákat azonosították rajta (Stoytcheva és Berry, 2009).

A *gpx4* mRNS szöveti eloszlását illetve az enzim aktivitását eddig kizárólag emlősökben vizsgálták. Patkányokban a *gpx4* gén expressziója jól detektálható a vizsgált szövetekben; vesében, szívben, izomban, májban, agyban, tüdőben, lépben és a tesztiszben (Imai és mtsi., 1995). A legnagyobb *gpx4* mRNS szinteket tesztiszben mérték. A GPx4 nélkülözhetetlen szerepet játszik a spermiumok érésében, így a hím patkányok reprodukív képességében kialakításában (Roveri és mtsi., 1994).

Kísérleteink kezdetén a *gpx4* gén(ek) szekvenciája egy halfajból volt publikálva, zebradánióból (*Danio rerio*, Thisse és mtsi., 2003). Emellett a GenBank-ban megtalálhatóak a lazac (*Salmo salar*), a tonhal (*Thunnus maccoyii*), és az aranyhal (*Carassius auratus*) *gpx4* szekvenciái. Két halfajban, zebradánióban és aranyhalban, két GPx4 fehérjét kódoló gént azonosítottak (*gpx4a* és *gpx4b*). A GPx4A és GPx4B fehérjék szekvenciája 80 %-ban azonos egy fajon belül, míg a különböző fajok között az ortológok hasonlósága több mint 90 %. Zebradánió embriókban a két gén már néhány napos korban szövetspecifikusan expresszálódik (Thisse és mtsi., 2003). Míg a *gpx4a* elsősorban a szikzacskóban, a májban és az úszóhólyagban mutatható ki az embriókban, addig a *gpx4b* a máj mellett, a szemben és az agy különböző területein expresszálódik.

4. ANYAGOK és MÓDSZEREK

4.1. Kísérleti állatok és kezelési körülmények

Valamennyi, a dolgozatban leírt kísérletet ponttyal végeztük el. A halakat a Tiszai Halgazdaság Fehértói Telepéről szereztük be. A halakat a kezelések előtt 400 l-es jól levegőztetett kádakban akklimatizáltuk, 2-3 hét időtartamig 15-16 °C-on. A kádak vizét hetente cseréltük. A kezelésekhez a halakat 100 l-es akváriumokba helyeztük át (mérettől függően 2-3 hal/akvárium). A kezelések minden mintavételi pontjában három vagy négy egyedet használtuk fel a mérésekhez. Az izolált szövetmintákat azonnal folyékony nitrogénbe helyeztük és –80 °C-on tároltuk a felhasználásig.

4.2. Alkalmazott fém- és hidegkezelések

A kezelésekhez használt fémkoncentrációt fémionra vonatkoztatva adjuk meg. Ez mind a Cd^{2+} , mind az As^{3+} esetében 10 mg/l végkoncentrációt jelent. A Cd^{2+} -t $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Fluka), az As^{3+} -t $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Fluka) formában használtuk, a mintavétel 0, 24, 48 és 96 óra elteltével történt.

A hirtelen hőmérsékletcsökkenés hatásának vizsgálata előtt a halakat 15 °C-on akklimatizáltuk. Ezután 7 °C-os vízhőmérsékletű akváriumba helyeztük át őket, 1 vagy 5 óra időtartamra. A mintavételek közvetlenül a hidegsokk után, illetve az azt követő akklimatizációs hőmérsékleten való 1 órás inkubáció elteltével történtek.

4.3. RNS preparálás fagyasztott mintákból

A fagyasztott vese, máj, és izom mintákból ~100 mg-nyit, a szív és agy mintákat teljes egészében (teljes agy vagy izolált szaglőlebeny, kisagy, középagyi régió) RNazol B oldatban (Tel-test, Inc. Texas) homogenizáltuk (2 perc, 1500 fordulat) és a gyártótól származó instrukciókat követve össz-RNS-t preparáltunk. Röviden összefoglalva, a homogenizátumokat 2-3-szor extraháltuk kloroformmal és centrifugáltuk (15 perc, 13500 rpm, 2 °C), majd a felső, vizes fázisból 0,75 térfogatnyi izopropanollal precipitáltuk az RNS-t. A csapadékot centrifugálással gyűjtöttük össze (5 perc, 15000 rpm, 4 °C) és egy éjszakán át 75 %-os etil-alkoholban mostuk, majd DEPC-vel (dietil-

pirokarbonát, Sigma) kezelt vízben oldottuk fel. Azért, hogy az enzimatis reakciókhoz kellő tisztaságú RNS-t kapjunk, újra precipitáltuk 1/20 térfogatnyi Na-acetát és 2,5 térfogatnyi 96 %-os etilalkohol hozzáadásával. A csapadékot egy éjszakán át 75 %-os etilalkohollal mostuk, majd felszuszpendáltuk 30-50 µl DEPC-vel kezelt desztillált vízben. A tisztított RNS mintákat 100 U RNáz mentes DNáz I-el (Roche) kezeltük rutinszerűen (2 óra, 37 °C).

Az RNS koncentrációjának meghatározására az $OD_{1_{A_{260}}} = 40 \mu\text{g/ml RNS}$ összefüggést alkalmaztuk. Amennyiben az A_{260}/A_{280} arány nagyobb volt 1.8-nél, akkor a minta tisztaságát megfelelőnek tekintettük.

4.4. Northern hibridizáció

Northern hibridizációhoz 20 µg totál RNS-t választottunk el 1,2 %-os denaturáló agaróz gélen (Sigma), 1 x MOPS pufferben (Sigma). Az elektroforetikus szeparálás előtt az RNS mintákat mintafelvívő pufferben (1 x MOPS, 6 % formaldehid, 50 % formamid) 55 °C-on 15 percig denaturáltuk. A futtatás szobahőmérsékleten történt, 5 V/cm feszültségen. Az elválasztást követően a gél 10 x SSC oldattal (20 x SSC: 3 M NaCl, 0,3 M trinátrium citrát, pH 7) kapilláris transzferrel vittük át nylon membránra (Amersham), egy éjszakán keresztül. A transzfert követően a filtert 2 x SSC-vel öblítettük, majd az RNS-t UV besugárzással rögzítettük a membránhoz (GS-Gene cross-linker, Bio-Rad).

Hibridizáláshoz a DNS próbákat (izolált DNS fragmentek) α - ^{32}P -dCTP-vel radioaktívan jelöltük, *random priming* technikával, High Prime DNA Labelling kit-et (Roche) használva. A be nem épült nukleotidokat Sephadex G-75 oszlopkromatográfiával távolítottuk el.

A filterek előhibridizálása 4-5 óra hosszan, a hibridizálásuk 14-16 óra hosszan történt 42 °C-on, 50 % formamid, 5 x Denhardt's reagens, 5 x SSC, 100 µg/ml denaturált bakteriális DNS tartalmú oldatban. A denaturált próbából 10^9 cpm/ml végkoncentrációt használtunk a hibridizálásokhoz. A nem specifikusan kötődött próbát 68 °C-on 0,1 x SSC-t és 0,1 % SDS-t tartalmazó oldatban történő mosással távolítottuk el.

4.5. Reverz transzkripció (RT)

A cDNS szintézis 5 µg totál RNS-ből kiindulva 20 µl végtérfogatban történt. A templát RNS-t 500 pmol random hexamer primer (Fermentas) jelenlétében 90 °C-on denaturáltuk, majd 200 U M-MuLV reverz transzkriptáz (Fermentas), 20 pmol dNTP keverék (Fermentas) és 1 x RT reakció puffer (Fermentas) jelenlétében 10 percig 37 °C-on, majd 45 percig 42 °C-on inkubáltuk. A reakciót 5 perces 65 °C-on történő inkubálással állítottuk le, majd –20 °C-on tároltuk.

4.6. PCR amplifikáció

A PCR amplifikálásokhoz templátként a RT reakció termékekből 1 µl-t használtunk fel reakciónként. A reakció elegy a következő komponenseket tartalmazta: 1 x PCR puffer/MgCl₂ (Fermentas), 1,25 U Dream Taq polimeráz (Fermentas), 250 µM koncentrációban a négyféle dNTP (Fermentas) és 50 pmol a megfelelő primerekből. A PCR amplifikálásokat egy PTC-200 Peltier Thermal Cyclerben (MJ Research) végeztük a következő programokkal.

Első lépés: 1 perc 95 °C-on, 2. lépés: (denaturálás) 30 másodperc 95 °C-on, 3. lépés: (*annealing*) 30 másodperc 55 °C-on, 4. lépés: (szintézis) 50 másodperc 72 °C-on. 5. lépés: a 2., 3., 4. lépés ismétlése *mtf-1* génnek esetében 31, *gpx* génnek esetében 34 alkalommal.

A programokon belül az *annealing* hőmérséklet és a ciklusok száma az adott primer pár függvénye volt, a szintézis reakció idejét pedig az amplifikált termék várható hossza határozta meg. Minden primer párra meghatároztuk az amplifikálási ciklusok maximumát, amíg a szintetizálódott termék mennyisége a ciklusok számával arányosan növekedett az általunk használt kísérleti körülmények között.

4.7. Primerek

Az *mtf-1* cDNS amplifikálásához használt primereket a japán gömbhal (*Takifugu rubripes*, [AJ131394](#)), a zebradánió (*Danio rerio*, [AF458116](#)), az egér (*Mus musculus*, [AJ131393](#)) és az ember (*Homo sapiens*, [X78710](#)) *mtf-1* szekvenciái alapján terveztük.

NF: 5' atgggagagaatggccct 3'

N1F: 5' atgctctttgaagacgagg 3'

CR: 5' ggtctttttacaacagcc 3'

A ponty *mtf-1.1* és *mtf-1.2* (*Cyprinus carpio*, [EU541410](#) és [DQ987534](#))
génspecifikus primereink a következők voltak.

3F: 5' acctgaaaacacatgttcgga 3'

7F: 5' gaggatgcgaatcattegct 3'

2R: 5' cctcagtgtttgagcctca 3'

21R: 5' catatccactcagccccct 3'

23R: 5' agtgtctgctcagccccct 3'

A *gpx4* cDNS-ek amplifikálásához használt primereinket a zebradánio (*Danio rerio*, *gpx4a* [NM_001007282](#) és *gpx4b* [NM_001030070](#)), az aranyhal (*Carassius auratus*, *gpx4a* [EF116921](#) és *gpx4b* [EF139090](#)), a lazac (*Salmo salar*, *gpx4b* [BT044014](#)) és a tonhal (*Thunnus maccoyii*, *gpx4* [EF452498](#)) ismert *gpx4* szekvenciái alapján terveztük.

4AF4: 5' tactgaaaggcagtcagtcgga 3'

4BF4: 5' cagcaagagcttcgccagag 3'

41R: 5' agatcytttccaccacgcttg 3'

A ponty *gpx4a* ([FJ656211](#)) és *gpx4b* ([FJ656212](#)) génspecifikus primereink a következők voltak.

4AF: 5' ggaaccaggaacaaattccc 3'

4F: 5' gtaaaaccccagtaaaactac 3'

4BR2: 5' cttggatcgctcattggtcc 3'

A *gpx1* cDNS-ek amplifikálásához használt primereinket a zebradánio (*Danio rerio*, *gpx1a* [NM_001007281](#) és *gpx1b* [NM_001004634](#)), az aranyhal (*Carassius auratus*, *gpx1* [EF139089](#)), a tonhal (*Thunnus maccoyii*, *gpx* [EF452497](#)) és az amur (*Ctenopharyngodon idella*, *gpx* [EU828796](#)) ismert *gpx1* szekvenciái alapján terveztük.

1F: 5' atkaagamgttttacgacct 3'

12R: 5'tcagcatcaatgtcgtggt 3'

A ponty *gpx1* ([GQ376155](#)) génspecifikus primereink a következők voltak:

5F: 5' tggcttcgagccaaattcca 3'

11R: 5' tcaatgtcgtggtgaggaa 3'

A PCR reakciókban az *gpx* és az *mtf-1* mRNS szinteket a ponty β -aktin mRNS mennyiségére normalizáltuk. A β -aktin primereket az M24113 szekvencia alapján terveztük. Ezzel a primer párral az amplifikálást 25 ciklus számban végeztük.

β -aktin-3: 5' gcaagagaggtatcctgacc 3'

β -aktin-4: 5' ccctcgtatggtggcacagt 3'

4.8. Gélelektroforézis, fragment izolálás

A PCR termékeket a fragment méretétől függően 0,7-1,8 %-os agaróz gélen, 0,1 μ g/ml ethidium bromid jelenlétében, TAE puffert használva (40 mM Tris-acetát, 10 mM EDTA pH 7,5) frakcionáltuk. Klónozáshoz, szekvenáláshoz a DNS fragmenteket a gélből izoláltuk. A DNS-t tartalmazó gélseleteket $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on fagyasztottuk, mechanikailag roncsoltuk, majd egy $0,45\text{ }\mu\text{m}$ pórusméretű szűrőt tartalmazó eppendorf csőben (Ultrafree-MC Centrifugal Filter Unit, Millipore) centrifugáltuk. A vizes oldatból a DNS-t 1/20 térfogat Na-acetát és 2,5 térfogat hideg 96 %-os etilalkohollal precipitáltuk, egy éjszakán át $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. A centrifugálást követően a csapadékot 70 %-os etilalkohollal mostuk. A DNS-t steril desztillált vízben oldottuk fel és a koncentrációját vagy az $\text{OD } 1_{\text{A}260} = 50\text{ }\mu\text{g/ml}$ DNS összefüggést használva határozzuk meg, vagy pedig agaróz gélen ismert mennyiségű DNS-hez viszonyítva becsültük meg.

4.9. Ligálás, transzformálás, plazmid DNS preparálás

Az izolált PCR termékeket *pGEM-T Easy* vektorba inzertáltuk. A ligáláshoz és a transzformáláshoz a *pGEM-T Easy kit*-et (Promega) használtuk fel. A ligálási reakció egy éjszakán át $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on ment, az inzert:vektor arány 3:1 volt. A transzformáláshoz a gyártó által ajánlott receptet követtük.

A plazmid DNS-ek preparálásához a QIAGEN *Plasmid Mini purification kit*-et használtuk a gyártó ajánlása szerint.

4.10. Géldokumentáció, denzitometrálas

Az ethidium bromiddal festett géleket, és az autoradiogramokat egy GDS 7500 típusú gél dokumentációs rendszeren analizáltuk, a *GelBase/GelBlot™ Pro Gel analysis* szoftvert használva.

4.11. Filogenetikai analízis

A *gpx* család filogenetikai analízise során a gerincesek jelenleg ismert *gpx* szekvenciáit hasonlítottuk össze a MEGA 4 software csomag felhasználásával (Center for Evolutionary Functional Genomics, Tempe, AZ USA). A bemutatott filogenetikai fát a *neighbor-joining* módszerrel készítettük. A következő szekvenciákat hasonlítottuk össze: *Cyprinus carpio*: *gpx1* ([GQ376155](#)), *gpx4a* ([FJ656211](#)) és *gpx4b* ([FJ656212](#)); *Danio rerio*: *gpx1a* ([NM_001007281](#)), *gpx1b* ([BC164446](#)), *gpx3* ([NM_001137555](#)) *gpx4a* ([BC075964](#)) és *gpx4b* ([BC095133](#)); *Carassius auratus*: *gpx1* ([EF139089](#)), *gpx4a* ([EF116921](#)) és *gpx4b* ([EF139090](#)); *Channa maculata*: *gpx* ([EU604243](#)); *Anguilla japonica*: *gpx1* ([FJ769219](#)) és *gpx4* ([FJ769220](#)); *Ctenopharyngodon idella*: *gpx* ([EU828796](#)); *Paralichthys olivaceus*: *gpx* ([EU095498](#)); *Oreochromis niloticus*: *gpx* ([DQ355022](#)); *Sparus aurata*: *gpx1* ([DQ524992](#)); *Platichthys flesus*: *gpx* ([AJ292042](#)); *Thunnus maccoyii* *gpx* ([EF452497](#)) és *gpx4* ([EF452498](#)); *Oplegnathus fasciatus* *gpx* ([AY734530](#)); *Oncorhynchus mykiss* *gpx* ([AF281338](#)) és 2. típusú *gpx* ([AY622862](#)); *Hypophthalmichthys molitrix* *gpx* ([EU108012](#)); *Dentex dentex* *gpx1* ([DQ414526](#)); *Hypophthalmichthys nobilis* *gpx* ([EU108014](#)); *Salmo salar* *gpx4* ([BT057643](#)) *gpx4b* ([BT044014](#)), *gpx7* ([BT057727](#)); *Perca flavescens* *gpx3* ([FJ826525](#)); *Xenopus tropicalis* *gpx1* ([NM_001015740](#)), *gpx3* ([BC061262](#)); *Xenopus laevis* *gpx8a* ([BC084801](#)) és *gpx8b* ([BC070970](#)); *Gallus gallus* *gpx3* ([NM_001163232](#)), *gpx4* ([BC095133](#)) és *gpx7* ([NM_001163245](#)); *Bos taurus* *gpx1* ([AF236854](#)), *gpx3* ([BC149266](#)), *gpx4* ([AF090194](#)), *gpx5* ([DQ058076](#)), *gpx7* ([NM_001101113](#)) és *gpx8* ([BC111287](#)); *Sus scrofa* *gpx1* ([NM_214201](#)), *gpx2* ([DQ898282](#)), *gpx3* ([AY368622](#)), *gpx4* ([NM_214407](#)), *gpx5* ([AF124818](#)) és *gpx6* ([NM_001137607](#)); *Macaca fuscata* *gpx* ([AB105162](#)), *gpx2* ([AB121003](#)), *gpx3* ([AB121008](#)) és *gpx4* ([AB121012](#)); *Rattus norvegicus* *gpx1*

(NM_030826), *gpx2* (NM_183403), *gpx3* (BC062227), *gpx4* (NM_017165), *gpx5* (NM_001105738), *gpx6* (NM_147165), *gpx7* (NM_001106673) és *gpx8* (NM_001106411); *Mus musculus gpx1* (NM_008160), *gpx2* (NM_030677), *gpx3* (NM_001083929), *gpx4* (NM_001037741), *gpx5* (NM_010343), *gpx6* (NM_145451), *gpx7* (NM_024198) és *gpx8* (NM_027127); *Homo sapiens gpx1* (NM_000581), *gpx2* (NM_002083), *gpx3* (NM_002084), *gpx4* (NM_002085), *gpx5* (NM_003996), *gpx6* (AY324826), *gpx7* (NM_001101113) és *gpx8* (NM_001008397).

4.12. Fehérjék kvantitatív meghatározása

A fehérjetartalom meghatározásához a májmintáinkból 5-szörös hígításban homogenizátumot készítettünk, majd 10 percig 10000 fordulat/perccel centrifugáltuk. Mind a homogenizátumból, mind a lecentrifugált felülúszóból meghatároztuk a fehérjetartalmat, Lowry és munkatársai (1951) módszerét alkalmaztuk. Marha szérum albuminnal készített kalibrációs görbe alapján a fotométer beépített szoftvere segítségével határoztuk meg a fehérjetartalmat.

4.13. Glutation mérési módszerek

4.13.1. A GSH szint meghatározása

A lecentrifugált minták felülúszójából határoztuk meg a GSH szintet Sedlak és Lindsay (1968) módszerét alkalmazva, melynek során Ellman-reagenssel nem fehérjéhez kötött SH-csoport meghatározást végeztünk TCA-val fehérjementesített mintából.

Szükséges oldatok:

5% TCA

10 mM DTNB (metanolban oldva)

0,4 M TRIS puffer pH 8,9

A homogenizátumot négyszeres mennyiségű TCA-val kicsaptuk. 10 perc 10.000 fordulat/perccel történő centrifugálás után a felülúszóból kivettünk 300 µl-t, majd ehhez 600 µl TRIS puffert adunk. A színreakciót 30 µl DTNB (Fluka) hozzáadásával indítjuk el. 412 nm-en fotometrálnuk, és a koncentrációt az alábbi képlet alapján határoztuk meg:

$$[\text{GSH}] = E \times V_{\text{összes}} \times 10^{-3} / \varepsilon \times l \times V_{\text{minta}}$$

E: extinkció, ε : moláris extinkciós koefficiens ($131000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), $V_{\text{összes}}$: mérőelegy térfogata ml-ben, V_{minta} : minta térfogata ml-ben, l: fényút hossza cm-ben

4.13.2. A GSSG szint meghatározása

A lecentrifugált minták felülúszójából határoztuk meg a GSSG tartalmat. Tietze módszerét alkalmaztuk (1969), melynek lényege, hogy a reakcióelegybe feleslegben adagoltunk GR enzimet, illetve NADPH-t (Sigma), így a minta GSSG tartalma visszaredukálódik GSH-ná. Kontrollként a Sedlak módszerrel kapott eredményeket (számítást ld. GSH szint meghatározásnál) vettük, és a 2 eredmény különbségéből következtetünk a GSSG mennyiségére.

A kísérletek során 250 µl felülúszót inkubáltunk 240 µl 0,05 M TRIS pufferben (pH 8,9), 5 µl (250 egység) GR enzimmal és 5 µl 100 µM-os NADPH-val, 30 percen át. Ezután GSH meghatározást végeztünk Sedlak módszere szerint.

$$[\text{GSSG}] = \text{össz } [\text{GSH}] (\text{Tietze}) - [\text{GSH}] (\text{Sedlak}) / 2$$

4.14. A lipidperoxidáció mérése

A mintáinkból 5-szörös hígítású homogenizátumot készítettünk, majd Placer és munkatársai módszerét alkalmaztuk némi módosítással (Placer és mtsi., 1966; Novák és mtsi., 1990). A többszörösen telítetlen zsírsavak oxidatív lebomlásakor keletkező malondialdehid (MDA) savas közegben, hőindukált reakcióban tiobarbitursavval színes trimetint képez, mely 532 nm-en abszorpciós maximummal rendelkezik.

Reagens összetétele:

15% TCA

0,375% tiobarbitursav

0,25 N HCl

A homogenizátumhoz tízszeres mennyiségű reagenst adtunk. Az elegyet forró vízfürdőn tartottuk 15 percen keresztül. Jégben lehűtöttük, majd 10 percen át 10.000 fordulat/perccel centrifugáltuk. A felülúszót 532 nm-en fotometráltuk. Vak oldatként desztillált vizet használtunk a reagensben homogenizátum helyett. A kalibrációt malondialdehid-dietilacetáttal készítettük. Az MDA koncentráció számítása:

$$[\text{MDA}] = E \times V_{\text{összes}} \times 10^{-2} / \epsilon \times l \times V_{\text{minta}}$$

E: extinkció, ϵ : moláris extinkciós koefficiens ($152000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), $V_{\text{összes}}$: mérőelegy térfogata ml-ben, V_{minta} : minta térfogata ml-ben, l: fényút hossza cm-ben

4.15. Enzimaktivitások mérése

4.15.1. A GPx aktivitás mérése

Ismert mennyiségű cumene-hidroperoxid (izopropilbenzén–hidroperoxid) és redukált GSH szubsztrát segítségével végeztük a meghatározást a mintáink lecentrifugált felülúszóiból (Chiu és mtsi., 1976).

Szükséges oldatok:

0,05 M TRIS-HCl puffer pH 7,5

2 mM GSH

3,3 mM cumene-hidroperoxid

15% TCA

0,4 M TRIS puffer pH 8,9

1 mM DTNB (5,5-ditiobis-nitrobenzoesav, metil-alkoholban oldva)

Minden egyes mintához saját vak oldatot készítünk a 2. táblázat szerint.

Vak	Minta
0,7 ml puffer (pH 7,5) 0,1 ml minta 0,1 ml GSH	0,7 ml puffer (pH 7,5) 0,1 ml minta 0,1 ml GSH 0,1 ml cumene- hidroperoxid
3 perc inkubálás, 37 °C-on	
1 ml TCA 0,1 ml cumene- hidroperoxid	1 ml TCA
Centrifuga 10 perc, 10000 fordulat	
2 ml puffer (pH 8,9) 1 ml felülúszó 0,1 ml DTNB	2 ml puffer (pH 8,9) 1 ml felülúszó 0,1 ml DTNB

2. táblázat: A GPx aktivitás mérése során a mintánkhöz és a vakhoz adott oldatok sorrendje és mennyisége.

Az extinkciókat 412 nm-en olvastuk le. Egységnyi enzim 1 perc alatt 1 μmol szubsztrátot bont le:

$$\text{EU/ml} = E \times V_{\text{összes}} \times 10^{-3} / \varepsilon \times l \times V_{\text{minta}} \times t$$

EU: enzimegység, E: extinkció, ε : moláris extinkciós koefficiens ($131000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), $V_{\text{összes}}$: mérőelegy térfogata ml-ben, V_{minta} : minta térfogata ml-ben, l: fényút hossza cm-ben, t: a reakció ideje (perc)

4.15.2. A GR aktivitás mérése

A lecentrifugált minták felülúszójából mértük a következő összetételben. A mérési hullámhossz: 373 nm volt. A reakciót 3 percig mértük, majd az 1 percre vonatkoztatott extinkció változással számoltunk.

A reakcióelegy összetétele:

0,5 ml 0,25 M KH_2PO_4 , pH 7,4

0,1 ml 25 mM EDTA

0,1 ml 7,5 mM NADPH

0,25 ml 0,25mM GSSG

0,05 ml minta

1 GR egységnek tekintettük, amikor 1 μmol GSSG redukálódott 1 perc alatt (37 °C, pH 7,4) (Pinto és Bartley, 1969).

$$\text{EU/ml} = E \times V_{\text{összes}} \times 10^{-3} / \varepsilon \times l \times V_{\text{minta}}$$

EU: enzimegység, E: extinkció, ε : moláris extinkciós koefficiens ($62200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), $V_{\text{összes}}$: mérőelegy térfogata ml-ben, V_{minta} : minta térfogata ml-ben, l: fényút hossza cm-ben

4.16. A DNS-károsodás vizsgálata

4.16.1. Genomiális DNS preparálás

50 μg szövetmintát 1 ml pufferben (100 mM TRIS-HCl, pH 8,5, 5 mM EDTA, 0,2% SDS, 200 mM NaCl, 100 μg proteináz K) inkubáltunk 55 °C-on egy éjszakán át. Az emésztés befejezése után 150 μl NaCl-t (6 M) adtunk a mintákhoz, és erőteljes szuszpendálást követően centrifugáltuk (15 perc 3000 fordulat/perc), a felülúszóból 0,75 térfogatnyi izopropanollal precipitáltuk a DNS-t. A csapadékot 75 %-os etanollal mostuk (-20 °C-on egy éjszakán át állni hagytuk) és centrifugáltuk. Az alkohol eltávolítása után a csapadékot desztillált vízben oldottuk fel, és -80 °C-on tároltuk.

4.16.2. DNS száltörés meghatározása fluorimetriás módszerrel

A DNS mintákat három részre osztottuk (F , F_{min} és F_{max} minta). F méréséhez a DNS-t jéghideg pH 11,8-es pufferban tartottuk, ami a részleges denaturációhoz megfelelő pH érték. F_{min} méréséhez a DNS-t jéghideg pH 11,8-es pufferben 1 percig

ultrahanggal szonikáltuk, így teljes kicsavarodást értünk el. Az F_{\max} méréséhez a DNS-t jéghideg pH 10,0-es pufferben tartottuk, ilyenkor nem csavarodott ki a DNS. Az inkubálás minden esetben 30 perc volt 0 °C-on, majd 15 perc 15 °C-on. Ezután 1 µl 0,67 µg/µl koncentrációjú ethidium-bromidot adtunk a mintákhoz, és megmértük a fluoreszcenciájukat 520 nm-es excitációs, és 590 nm-es emissziós hullámhosszokat használva (Birnboim és Jevcak, 1981).

A különböző módon kezelt minták segítségével meghatároztuk a kettős szálú DNS százalékos arányát, a következő képlet szerint:

$$\text{ds DNS}\% = (F - F_{\min}) / (F_{\max} - F_{\min}) \times 100$$

4.17. Statisztikai analízis

Kísérleteinket minden kezelési pontban 3-4 hallal párhuzamosan végeztük. A statisztikai különbségeket egy-utas ANOVA teszt (MedCalc Statistical Software version 9.4.2.0., Broekstraat, Belgium) felhasználásával vizsgáltuk, Student-Newman-Keuls *post hoc* teszt alkalmazásával. A különbségeket szignifikánsnak tekintettük, ha $P < 0,05$.

5. EREDMÉNYEINK

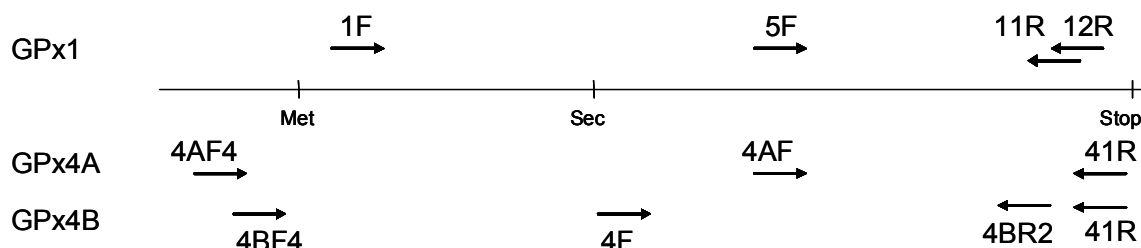
Kísérleteink során RT-PCR technikával szeretnénk követni a pontyokban lezajló génexpressziós változásokat különböző idejű nehézfém terheléseket, illetve hirtelen hőmérsékletváltozást követően. Ehhez elengedhetetlen lépés volt a génspecifikus primerek tervezése. A GenBank adatbázisában történő keresések szerint pontyból sem *mtf-1*, sem *gpx* szekvenciákat nem azonosítottak korábban. Így első feladatunk ezeknek a géneknek az izolálása volt.

Mindenekelőtt megkerestük a GenBank-ban fellelhető *mtf-1* géneket. Több emlősfajból rendelkezésünkre álltak a vizsgált gének esetében a teljes kódoló szekvenciák, többek között patkányból, egérből és emberből is. Kísérleteink kezdetén, egyik gén sem volt ismert sem madár, sem hüllő, sem kételtű fajokból. Ellenben találtunk szekvencia-információkat néhány halfajból. Az aminosav sorrendek összehasonlítása során olyan régiókat kerestünk, amelyek a legnagyobb homológiát mutatták a különböző fajok között és ezekre primert terveztünk. A primerek tervezése során arra törekedtünk, hogy a gének kódoló szekvenciáinak minél nagyobb részleteit amplifikálhassuk fel, így lehetőség szerint a start és a stop kódhoz közeli régiókat választottunk.

5.1. A *gpx4*-specifikus cDNS-ek azonosítása pontyból

Halakból mindössze négy fajból állt rendelkezésünkre *gpx4* szekvencia-információ. Zebradánióból és aranyhalból, mindkét faj a pontyfélék családjába tartozik, két-két *gpx4* gént (*gpx4a* és *gpx4b*) azonosítottak. A zebradánió *gpx4* gének esetében meghatározták a teljes kódoló régió szekvenciáját, azonban aranyhalból csak részleges szekvencia-információk álltak rendelkezésünkre. A másik két halfaj esetében, a tonhal *gpx4* szekvenciája a zebradánió *gpx4a*, a lazacé pedig a zebradánió *gpx4b* génhez mutatott nagyobb hasonlóságot. Primereinket az ismert hal szekvenciák alapján úgy terveztük meg, hogy ha pontyban létezik *gpx4a* és *gpx4b* gén is, azok specifikusan azonosíthatók legyenek. Reverz primerünket (41R) egy olyan szakaszra terveztük, mely nukleinsav szinten is csaknem 100 %-os azonosságot mutatott az összes ismert hal

gpx4a és *gpx4b* gén szekvenciái között, közel a gének stop kódjához. A zebradánió és a tonhal szekvenciája alapján tervezett *gpx4a*-specifikus *forward* primer (4AF4), illetve a zebradánió és a lazac alapján tervezett *gpx4b*-specifikus 4BF4 primer az adott gén promóter-régiójához volt specifikus (7. ábra).



7. ábra: A glutation peroxidáz specifikus primerek sematikus elhelyezkedése.

Az ábra felső részén a *gpx1*-specifikus primerek, az alsó részén a *gpx4*-specifikus primereket találhatók. A nyilak a primerek irányultságát jelölik.

Az RT-PCR amplifikálásokhoz templatként kezeletlen ponty máj és agyszövetéből preparált RNS-eket használtunk fel, mivel zebradánió embriók esetében ebben a két szövetben tudták a legnagyobb *gpx4* mRNS szinteket kimutatni (Thisse és mtsi., 2003). Mindkét reakció során egyetlen terméket kaptunk, melynek mérete megegyezett a specifikus termék várt méretével. Az így kapott termékpulációkat megszekvenáltattuk. A populációk szekvenciáinak elemzése során egyértelművé vált, hogy primereink specifikusak voltak az adott génre, felhasználásukkal azonosítani tudtuk a ponty *gpx4a* és *gpx4b* génjét is. A RCR termékek klónozására nem volt szükség.

A 4AF4-41R primerpár kizárólag a *gpx4a* gén egy 560 bp-os szakaszát, míg a 4BF4-41R primerpár a *gpx4b* gén 519 bp-os szakaszát, szinte a teljes fehérjét kódoló szakaszokat és a promóter régiók egy-egy részét amplifikálta fel. A két cDNS szekvenciája a 477 nukleotidnyi fehérjét kódoló szakaszon 107 nukleotidban különbözik egymástól, ami 78 %-os azonosságot jelent a két szekvencia között. Mindkét ponty *gpx4* gén kódoló szekvencia teljes hosszúságában végigvezet egy-egy *open reading frame*. A fehérjék aminosav sorrendjének 98,6 %-a vált ismertté. A 107 eltérő nukleotid 35 aminosav különbségét okozza, emiatt a két fehérje 79 %-ban egyezik meg egymással.

A ponty GPx4 szekvenciái a zebradánió ortológ GPx4 szekvenciáihoz mutatják a legnagyobb hasonlóságot. A GPx4A szekvenciák 89 %-ban, míg a GPx4B szekvenciák 92 %-ban azonosak a fajok között.

Mindkét ponty GPx4 szekvenciában megtalálhatóak a GPx-ok katalitikus tetradját kialakító kulcsfontosságú pozíciójú aminosavak; a ⁴⁶Sec, a ⁸¹Glu, a ¹³⁶Trp és a ¹³⁷Asn. A szekvencia-összehasonlítások során 21 olyan aminosavat figyelhetünk meg, melyek különböztek a paralóg, de megegyeztek az ortológ szekvenciák között (8. ábra).

		**
DR GPx4At.....t.....k.....	
CC GPx4A	msaqledwqsaksiyefsatdidgnevslkygrvviitnvaskugktpvnysqfaemh 60	
CC GPx4B	.C..AN.....K.....Y.C.....T.L.A..	
DR GPx4B	.C..AN.....I.....D.....Y.C.....T.L.A..	
		*
DR GPx4A	...s....r.....n...r.....k....e.....g.....	
CC GPx4A	akyterglslilafpshqfghqepgtnsqikefansynaqfmdfmskidvngdsahplwkw 120	
CC GPx4B	.T.A.K..R..G..CN...K....EAE.....KG.K.E..L....E....G.....M	
DR GPx4B	VT.A.K..R..G..CN...K....SEAE.....KG...E..L.....A.....M	

DR GPx4A	.d....k.fl.....q.....	
CC GPx4A	keqpngrgifgngikwnftkflinregqvvkrysplsdpsvvekd 165	
CC GPx4B	...K...TL..N.....G.MD.....	
DR GPx4B	...K...TL..N.....D.....G.MD.....	

8. ábra: Ponty (CC) és zebradánió (DR) GPx4A és GPx4B szekvenciáinak összehasonlítása.

A pontok a ponty GPx4A-val megegyező aminosavakat jelölik. Csillagok és félkövér betűk jelölik az aktív centrum kialakításában részt vevő hat aminosavat.

A megismert ponty *gpx4* szekvenciák alapján a későbbi expressziós vizsgálatokhoz, olyan génspecifikus primereket terveztünk, amelyek a génnek egy-egy rövidebb 250-300 nukleotidnyi 3' végi szakaszát amplifikálják fel. Az általunk használt reakcióparaméterek mellett a 4AF-41R primerpárral csak a *gpx4a*-, míg a 4F-4BR2 primerpárral csak a *gpx4b*-templátokról történik amplifikálás (7. ábra).

5.2. A *gpx1* specifikus cDNS azonosítása pontyból

Hasonlóan a *gpx4* gének azonosításához az ismert *gpx1* gének szekvenciáit is kikerestük a GenBank-ból. Az ismert emlős (patkány, egér, ember) szekvenciák mellett négy halfaj *gpx1* szekvenciái álltak rendelkezésünkre. Egy-egy *gpx1* gén azonosítása történt meg aranyhalból, amurból és a tonhalból is. Az aranyhal esetében a *gpx1* génnek csak a 3' végét ismerjük, a másik két halfajból azonban a teljes fehérjét kódoló szekvencia meghatározott. A halak között is kivételt képez a zebradánió, az egyetlen faj, amelyben két *gpx1* gént azonosítottak; *gpx1a* és *gpx1b*. A szekvencia összehasonlítások alapján minden eddig azonosított *Cyprinidae* családba tartozó halfaj *gpx1* szekvenciája a zebradánió *gpx1a* szekvenciájához hasonlít nagyobb mértékben. Primereinket a pontyfélék *gpx1* szekvenciái alapján terveztük, a szekvenciák összehasonlítását követően olyan szakaszokat választottunk ki a primerek tervezéséhez, melyek a lehető legnagyobb homológiát mutatták aminosav és nukleinsav szinten is. Az általunk tervezett 1F *forward* és 12R *reverz* primer a *gpx1* gén kódoló régióján helyezkedik el, közel a start illetve a stop kódhoz (7. ábra).

Templátként, hasonlóan a *gpx4* gének izolálásához, kezeletlen pontyok máj és agyszövetéből preparált RNS-eket használtunk fel. A PCR reakciók során egy 480 nukleotid hosszú terméket amplifikáltunk fel, melynek mérete megegyezett az ismert *gpx1* szekvenciák alapján várt termék méretével. A termékpopuláció szekvenálása és elemzése alapján mindkét templátról ugyanaz a *gpx1* szekvencia volt felamplifikálható. Bár egyértelműen tiszta populációkat kaptunk, az agaróz gélből izolált terméket PCR klónozó vektorokba ligáltuk, majd meghatároztuk három független rekombináns plazmidban található inzert nukleotid sorrendjét. A rekombinánsok szekvenciája megegyezett egymással, illetve a korábban szekvenált PCR populáció szekvenciájával.

Az általunk azonosított ponty *gpx1* nukleotid szekvencia 477 bp hosszúságú, ez a teljes kódoló régió 94 %-a; egy *open reading frame* vezet végig rajta. Az amur *gpx* szekvenciájához mutatja a legnagyobb hasonlóságot, ami 91 % nukleinsav szinten. Az amur a zebradánióhoz hasonlóan a pontyfélék családjába tartozó faj. Az általuk kódolt fehérjék 94 %-ban azonosak. Ha a zebradánió GPx1A és GPx1B szekvenciáival hasonlítjuk össze, a ponty GPx1 fehérje a zebradánió GPx1A-hoz hasonlít nagyobb mértékben (90%), a GPx1B-vel mindössze 75 illetve 78 %-ban azonos, nukleinsav

illetve fehérje szinten. A ponty GPx1 szekvenciájában megtalálhatóak a GPx-ok katalitikus tetrádjának jellemző aminosavai (9.ábra).

```

                **                               *
CC GPx1      NFSSLKGKVVLIENVASLUUGTTVRDYTMNELHSRYADQGLVILGAPCNQFGHQENAKND 60
CI GPx       .....C.....C...
DD GPx1A     .....V.....C..E

CC GPx1      EILLSLKYVRPGNGFEPNFQLLEKLEVNGANAHPLFVFLKEKLPQPSDDSVSLMGDPKFI 120
CI GPx       ...K.....K.....E.....A.....
DD GPx1A     ...Q.....K.....E.....A.....P.....

                ***
CC GPx1      IWSPVNRNDVSWNFEKFLIGPDGEFFKKYSRRFLTSDIE 159
CI GPx       .....IA.....R.....
DR GPx1A     ....C...I.....R.....I..D

```

9. ábra: A ponty (CC) GPx1 szekvenciájának összehasonlítása az amur (CI) és a zebradánió (DR) GPx1 szekvenciákkal.

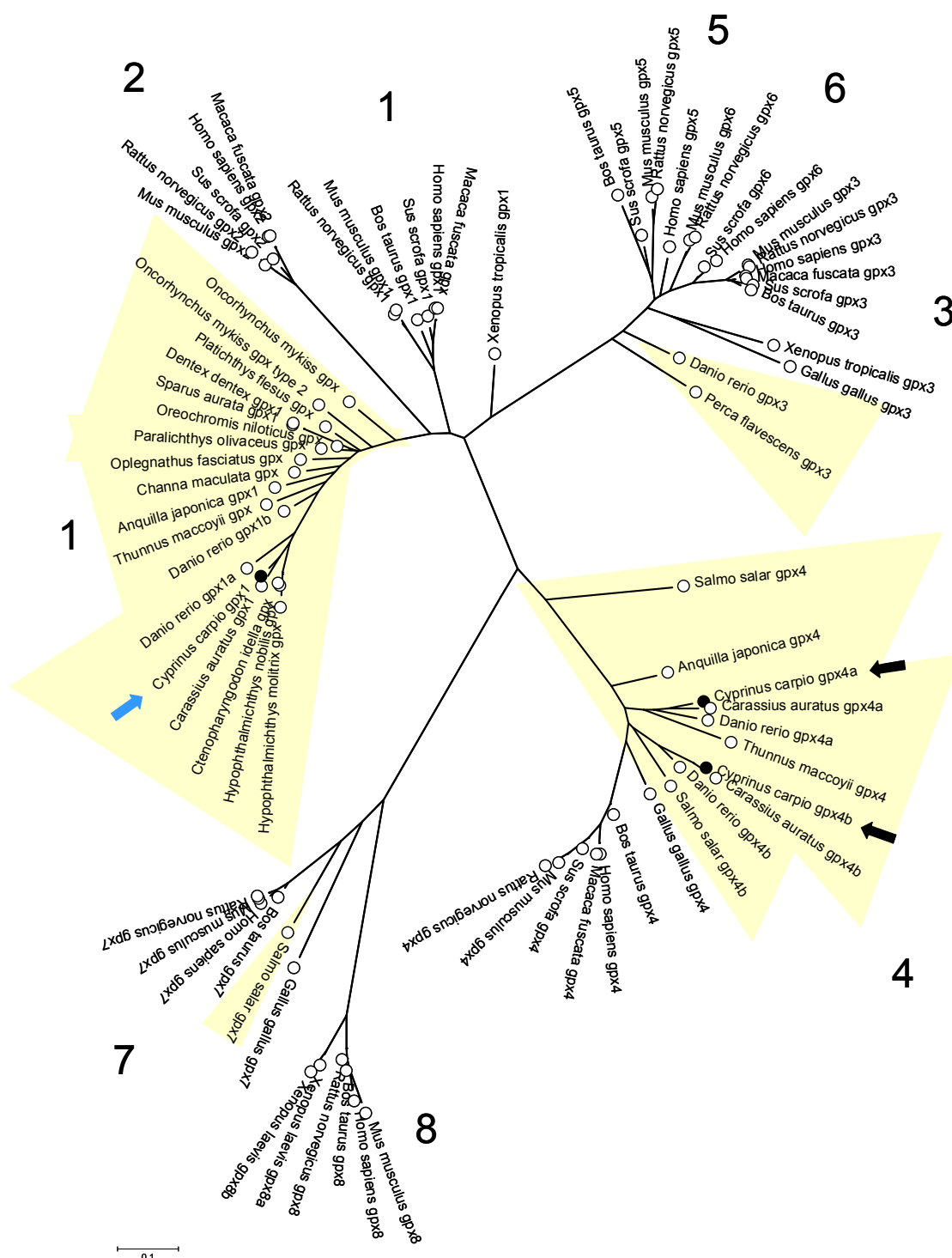
A pontok a ponty GPx1-gyel megegyező aminosavakat jelölik. Csillagok és félkövér betűk jelölik az enzim aktív centrumának kialakításában részt vevő hat aminosavat.

További kísérleteinkhez a megismert szekvencia alapján egy újabb primer párt terveztünk. Az 5F-11R primerpár segítségével specifikusan a ponty *gpx1* gén egy 250 nukleotid hosszú szakaszát tudtunk felamplifikálni, az általunk használt reakciókörülmények között. (7. ábra).

5.3. A *gpx* család filogenetikai analízise

Filogenetikai elemzést végeztünk a legközelebbi szomszédokból kiindulva a *neighbor joining*-módszer alkalmazásával. A törzsfá megrajzolását a MEGA 4 Szoftverrel végeztük. A GenBank-ban megtalálható gerinces *gpx* szekvenciák közül a filogenetikai elemzést kiterjesztettük minden jelenleg ismert hal, kételtű, madár, illetve több emlős (ember, makákó, egér, patkány, tehén és sertés) *gpx* szekvenciára.

Az elemzés alapján készített dendrogram jól tükrözi a szekvenciák közti hasonlóságokat és különbségeket (10. ábra).



10. ábra: A *gpx* család filogenetikai törzsfája.

A gyökér nélküli dendrogram a rokonsági kapcsolatokat ábrázolja. Az ághosszak *substitution/site* (0,1) egységekben mutatják a szekvenciák közti különbségek mértékét. Sárga háttérrel jelöltek a jelenleg ismert hal *gpx* szekvenciák. Kék nyíl jelöli a ponty *gpx1* és fekete nyilak a két ponty *gpx4* szekvenciákat.

A filogenetikai törzsfa első nagy ágát a *gpx1* és *gpx2* családba tartozó szekvenciák alkotják. Érdekes, hogy a halak *gpx1* génjei a szekvencia elemzés alapján, közelebb állnak az emlősök *gpx2* génjéhez, mint az emlős *gpx1*-hez. A második nagy ághoz a *gpx3*, a *gpx5* és *gpx6*-os család génjei tartoznak. Azonban ezek a szekvenciák olyan nagy hasonlóságot mutatnak egymással, hogy nem lehetséges a kapcsolatok pontos feltárása, elkülönítése. A *gpx5* és *gpx6* családokból jelenleg még nem ismertek hal szekvenciák, feltételezhetően ezek segítségével pontosítani lehetne az rokonsági kapcsolatokat a családok között. A törzsfa harmadik nagy ágát az egy monofiletikus csoportba tartozó *gpx7*-*gpx8* család illetve a *gpx4* család tagjai alkotják. A *gpx7* és a *gpx8* család tagjai közül jelenleg csak kevés szekvencia ismert, így a pontos rokonsági kapcsolatok itt sem állapíthatók meg. A *gpx4* családból azonban számos hal, és magasabbrendű gerinces szekvenciája áll rendelkezésünkre. A filogenetikai fa alapján a halak *gpx4b* génjei közelebbi kapcsolatban állnak az emlős *gpx4* génekkel, mint a *gpx4a* gének (10. ábra).

5.4. Az *mtf-1* specifikus cDNS-ek azonosítása pontyból

Kísérleteink kezdetén csupán a zebradánió és a japán gömbhal *mtf-1* génjének szekvenciája állt rendelkezésünkre halakban, ezeket hasonlítottuk össze az egér és az ember *mtf-1* szekvenciáival, mivel kételtűekből, hüllőkből vagy madarakból az *mtf-1* gén azonosítása még nem történt meg.

Már az aminosav szintű összehasonlításoknál is látszott, hogy a különböző fajok MTF-1 szekvenciái között egyedül a DNS-kötő Zn-finger régiók mutatnak nagyfokú homológiát. A C-terminális transzkripciós domének esetében a fajok között méretbeli különbségek is láthatók, egyedül a stop kód környezetében található egy rövid homológ szakasz. A nukleinsav összehasonlítások alapján két *forward* primert (NF és N1F) terveztünk a kódoló régióra, viszonylag közel a start kódhoz, míg a stop kódhoz közeli homológ szakaszra egy reverz primert (CR) (11. ábra).

Az NF-CR primerpár egy 1743 bp-os terméket amplifikál fel, amely a zebradánió kódoló régiójának 97,8 %-a. Ezt a reakcióterméket használtuk templátként a szemi-nesztid PCR reakcióban, az N1F-CR primerpárral történő amplifikáláshoz. Az így kapott PCR termékeket gélből izoláltuk, klónoztuk, majd a veséből és az agyból származó minták esetében is 3-3 független transzformáns inzertjét megszekvenáltattuk. A hat vizsgált cDNS szekvencia két csoportba tartozott. Az egyik csoport, amelyet *mtf-1.1*-nek neveztünk el, megtalálható volt a veséből (3/3) és az agyból (2/3) származó PCR populációkban is. A harmadik agyból származó minta azonban olyan különbségeket mutatott a másik öt szekvenciához képest, melyet már nem lehetett a Taq-polimeráz által generált hibának betudni. Ezért megszekvenáltattunk további öt, független rekombinást. Az összesen nyolc agymintából származó inzert szekvenciájából öt az *mtf-1.1*-hez hasonlított, a másik három, tőlük részben eltérő szekvencia szintén az *mtf-1* génhez mutatja a legnagyobb hasonlóságot, így azt *mtf-1.2*-nek neveztük el.

Az *mtf-1.1* cDNS 1693 bp, az *mtf-1.2* 1696 bp hosszú. A három nukleotidnyi eltérés egy delécio eredménye közel a cDNS 3' végéhez. A két cDNS szekvenciája 26 nukleotidban tér el egymástól. Mindkét szekvencián végigvezet egy-egy *open reading frame*. A 26 nukleotid különbség kilenc aminosav eltérését eredményezi, illetve a három hiányzó nukleotid egy aminosav hiányát okozza. A különbségek a transzaktivációs

doménekre korlátozódnak, a Zn-finger domének 100 %-ban megegyeznek egymással. Nukleinsav és fehérje szinten is 98%-os a ponty *mtf-1* szekvenciák hasonlósága.

CC MTF-1.1	-----EEDVDKLCREEDDEDEMAHFDKDDLLISGPSSSSGRVYDRTTV	43
CC MTF-1.2	-----	43
DR MTF-1	MGENGPLSETAMLFED.....G...E...K..N....GNM.....T.....	60
	NF N1F	
CC MTF-1.1	LIEQDPIRLDEEGEEDGMAFLQEGECEGDEGSLAFMGDPDGMSSQGYIHHTISPDQIQFII	103
CC MTF-1.2	103
DR MTF-1T..P.--.....	118
	↓ Zn-finger domének	
CC MTF-1.1	NPGSTPMPRNIEGATLTLHSECPETKQREVKRYQCMFEGCTRYSTAGNLRTHQKTHRGE	163
CC MTF-1.2	163
DR MTF-1L.....	178
CC MTF-1.1	YTFVCNQCGCGKAFLTSYSLKIHVVRVHTKEKPFECDVQGCEKAFNTLYRLKAHQRLHTGK	223
CC MTF-1.2	223
DR MTF-1	238
CC MTF-1.1	TFNCESEGCTKYFTTSLDLRKHIRHTHTGEKPFRCAGDGCCKAFAASHHLKTHVRHTHTGEK	283
CC MTF-1.2	283
DR MTF-1D.....	298
	↓ savas aminosavakban gazdag domén 7F	
CC MTF-1.1	PFFCPSDGCETKFSSQYSLKSHIRGHDKGPAFTMSSHPLSEEDANHSICLSDLSLISTDFE	343
CC MTF-1.2	343
DR MTF-1S..V.G.....S.	358
	↓ prolin-gazdag domén	
CC MTF-1.1	LQENHNSQGLDLNSVTPIRIFELMFQSPENSVSPDDPKPTDNPAESFGLPSPQTAAADI	403
CC MTF-1.2L.....S.....T.EV	403
DR MTF-1E.....ESL.....S.P..A	418
	21R / 23R	
CC MTF-1.1	STQ-----PPSSTSSPSSSITTPALEAQSPPTALPSQSAPPPPAVSSSTLLTSTFPCAPPT	458
CC MTF-1.2	.A.-----	458
DR MTF-1	..HPAFPQ..P..C.S.C...A..QD..T...--T.Q....-...SSQ..S..S...S	474
	↓ szerin/treonin-gazdag domén	
CC MTF-1.1	SSHSHEVPAPSAPSVAQHMTLTSTAQPVPSPAPGVSSVPVTTTEVTAAVTHTVPLA-P	517
CC MTF-1.2T.....T.....T.....T.	518
DR MTF-1	..QPA..SS.....AT.....---M..S.SS...AS.....G.A.....--	528
CC MTF-1.1	PPPTITIAPTGLQPSIVMSDQNLQWILSSATSAQQNPEQQGPKVE-----	564
CC MTF-1.2	565
DR MTF-1	-A...S.....L.....A.....KVFFTTA	581
	CR	

11. ábra: A ponty (CC) MTF-1.1, MTF-1.2 és a zebradánió (DR) MTF-1 szekvenciájának összehasonlítása.

A pontok a ponty MTF-1.1-gyel megegyező aminosavakat jelölik. A függőleges nyilak és kék feliratok az egyes domének kezdetét jelzik, a zebradánió szekvenciájának alapján jelölve. Aláhúzva és zölddel jelölve az általunk használt primerek szekvenciája és helyzete látható.

A ponty MTF-1.1 hasonlósága a zebradánió MTF-1-hez 88%-os, míg a ponty MTF-1.2 és a zebradánió MTF-1 azonossága 87 %-os. A DNS-kötő doménekben mindössze két aminosavnyi eltérés található; a prolin- és a szerin-treonin gazdag transzaktivációs domén hasonlósága a fajok között azonban csak 76 illetve 74 %-os (11. ábra).

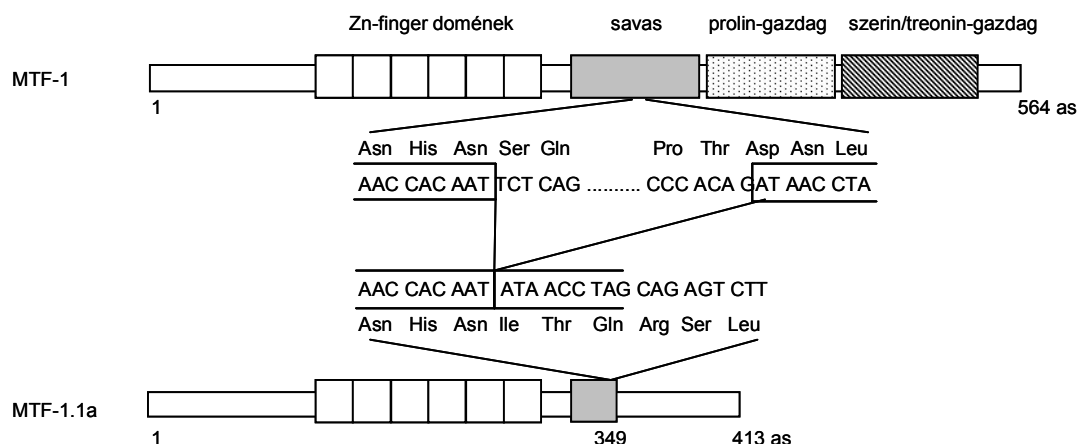
A ponty *mtf-1* szekvenciák azon szakaszára, ahol a legtöbb nukleotid-különbséget találtuk, génspecifikus reverz primereket terveztünk (21R és 23R). Ezeket egy közös, a Zn-finger régióra eső *forward* primerrel (7F) párban használva specifikusan tudtuk követni az *mtf-1.1* (7F-21R) és az *mtf-1.2* (7F-23R) gén expresszióját a további vizsgálataink során (11. ábra).

Az előzőekben leírt kísérleteink során, amikor az NF-CR primerpárral felamplifikáltuk a ponty *mtf-1.1* és *mtf-1.2* gének egy 1743 bp-os szakaszát; majd az ezt követő szemesztid PCR (N1F-CR) reakció termékeit klónoztuk, az agyból származó minták között találtunk két olyan klónt, amely a várt méretünél egy nagyjából 100 nukleotiddal rövidebb inzertet hordozott. A rövidebb inzert a szekvenciájának elemzése során 100 %-os azonosságot mutatott az *mtf-1.1* nukleotidsorrendjével, egy 103 bp-os belső szegmens kivételével. Ezt a valószínűleg alternatív *slicing* során keletkező rövidebb szakaszt, *mtf-1.1a*-nak neveztük el.

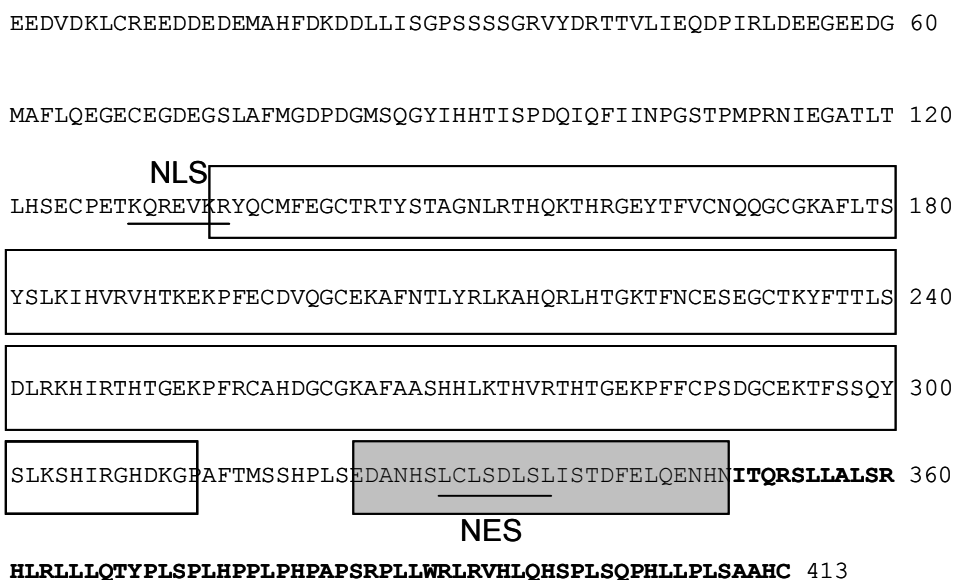
Az *mtf-1.1a* szekvenciában a 103 nukleotid hiánya *frame shift*-et okoz az eredeti leolvasási kerethez képest, ami a transzláció korai terminációját okozza. Az MTF-1.1a fehérje tartalmazza az MTF-1.1 fehérje első 349 aminosavát, majd 64 olyan aminosav következik, melyek sorrendje nem hasonlít az ismert fehérjékhez. A 64 aminosav 60 %-a hidrofób, ezen belül 18 db leucint és 11 db prolint tartalmaz. A 349 aminosavban megtalálható a hat Zn-finger DNS-kötő domén, a NES és NLS szignál, illetve a savas aminosavakban gazdag transzaktivációs domén első 26 aminosava (12. ábra).

A további kísérleteinkben a korábban leírt 7F-21R primerpárt használva, a kétféle templátról készült termékek a méretkülönbség alapján jól elkülöníthetők voltak.

A



B



12. ábra: A ponty MTF-1.1 izoformák szerkezetének összehasonlítása (A), és MTF-1.1a feltételezett fehérje szekvenciája (B).

Az ábrákon fehér téglalapok jelölik a DNS-kötő Zn-finger doméneket, szürke téglalapok a savas aminosavakban gazdag; pontozott illetve vonalkázott téglalapok a prolin-gazdag, és a szerin/treonin-gazdag transzaktivációs doméneket. Az „A” ábra középső része az *mtf-1.1* splice-variánsra jellemző *frame shift* kialakulását mutatja. A „B” ábrán vastagon szedettek az MTF-1.1-től eltérő aminosavak. Aláhúzás jelöli a sejtmagi lokalizációs és export szignál szekvenciákat.

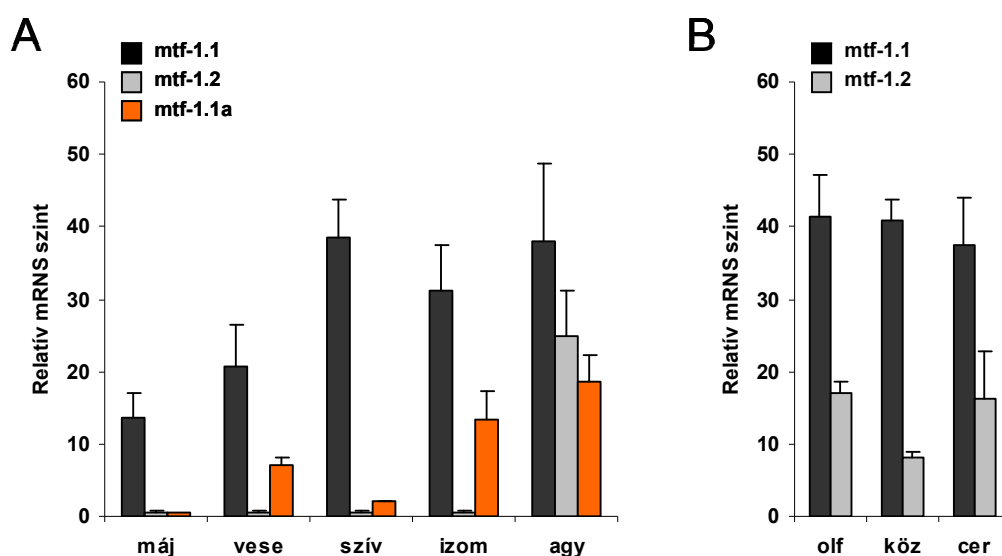
5.5. Ponty *mtf-1* gének expressziója

5.5.1. Az *mtf-1* gének szövetspecifikus expressziója

Kísérleteink során félkvantitatív PCR reakciókban követtük a ponty *mtf-1* gének és a *splice*-variáns transzkripcióját génspecifikus primereink segítségével. Az adott *mtf-1* mRNS mennyiségeket egy belső kontrollhoz, a β -*aktin* mRNS szintjéhez viszonyítva adjuk meg. Az alapexpressziókat kezeletlen halak máj, vese, szív, izom és agy szöveteiben, illetve három különböző agyrégióban vizsgáltuk; a szaglőlebenyben, a kisagyban, és a középagyi régióban.

A legmagasabb össz-*mtf-1* mRNS szintet agyban mértük, a legalacsonyabbat májban és vesében. Az agy és a máj értékek között közel ötszörös különbségeket mutattunk ki. Minden szövetben az *mtf-1.1* mRNS szint volt a meghatározó, az össz-*mtf-1* mintázatához hasonló eloszlást mutatott. Az *mtf-1.2* mRNS kizárólag a kontroll állatok agyszövetében volt jelen kimutatható mennyiségben. Itt az *mtf-1.1/mtf-1.2* aránya közel három a kettőhöz volt. Az *mtf-1.1a splice*-variáns szintje is agyban volt a legmagasabb, közel a fele volt az *mtf-1.1* mennyiségének. Vesében, az agyban mért *mtf-1.1a* érték egyharmadát, a szívben az egynegyedét tudtuk kimutatni; míg májban az *mtf-1.1a* mRNS nem volt detektálható mennyiségben jelen (13.A ábra).

Az egyes agyrégiókat külön vizsgálva, közel egyforma *mtf-1.1* mRNS szinteket tapasztaltunk. Az *mtf-1.2* esetében viszont különbségeket figyeltünk meg az agyrégiók között. Az *mtf-1.2* mRNS szint a középagyi régióban csak a fele volt a szaglőlebenyben illetve a kisagyban mérhető értékeknek (13.B ábra).



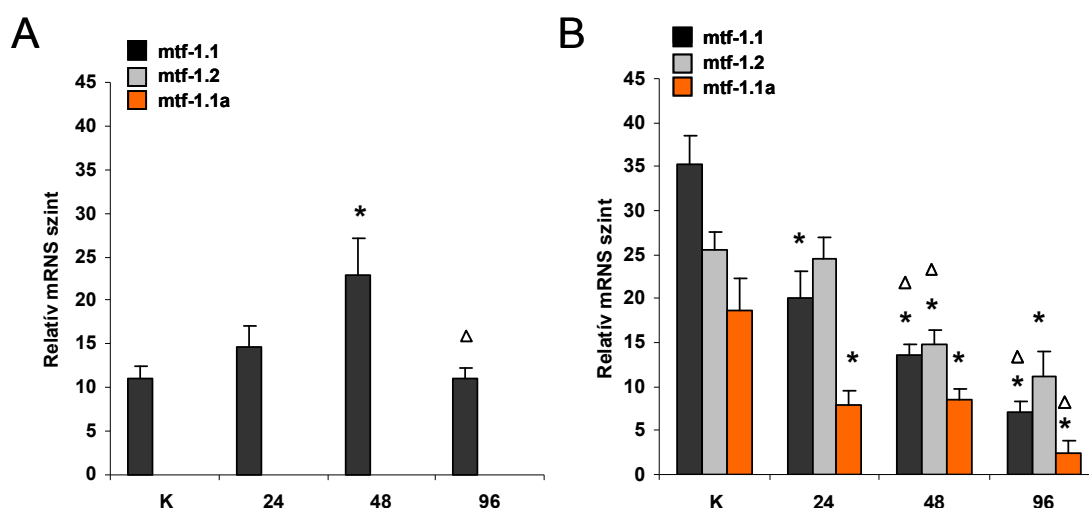
13. ábra: Az *mtf-1* gének expressziója.

Kezeletlen ponty szövetekben (A) és három különböző agyrégióban (B); a szaglőlebenyben (olf), a középagyi régióban (köz) és a kisagyban (cer). Az egyes gének esetében a β -aktin-hoz viszonyított mRNS szinteket ábrázoltuk.

Northern-hibridizációs kísérleteink során meghatározzuk a két ponty *mtf-1* génről átíródó mRNS méretét. Az *mtf-1* gének 5' régiójára tervezett 3F-2R primerpárral felamplifikált 200 bp-os DNS szakaszt használtuk hibridizációs próbaként. Az agy minták estében kétféle mRNS-t tudtunk kimutatni. Az *mtf-1.1* mérete kb. 3230 míg az *mtf-1.2* mRNS-é 3370 nukleotid volt. Az *mtf-1.1/mtf-1.2* mennyiségének aránya 1,6 volt, mely jól közelítette RT-PCR reakciókban meghatározott arányokat az agyban.

5.5.2. Cd^{2+} -kezelés hatása az *mtf-1* gének expressziójára

10 mg/l koncentrációjú Cd^{2+} -kezelés hatását a májszövetben és agyban, illetve egyes agyrégiókban vizsgáltuk. Májban a Cd^{2+} -kezelés mérsékelt módon indukálta az *mtf-1.1* gén expresszióját. 48 órás inkubálást követően tapasztaltuk a legnagyobb, 210 %-os mRNS szint növekedést. 96 óra után a mRNS szint lecsökkent, a kontroll állatokéhoz hasonló szinteket mértünk. A *splice*-variáns *mtf-1.1a* és az *mtf-1.2* mRNS nem volt kimutatható mennyiségben jelen (14.A ábra).



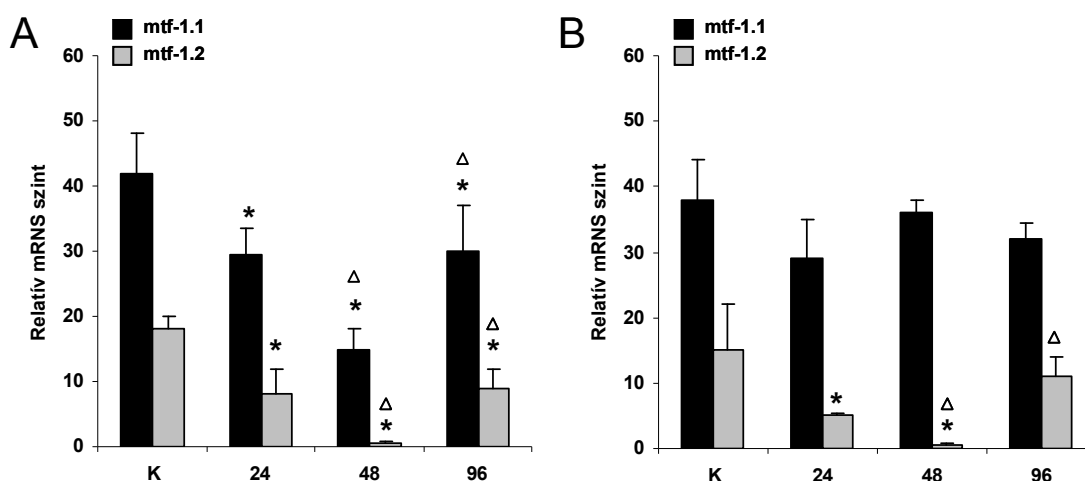
14. ábra: Az *mtf-1* gének expressziójának változása máj- (A) és agyszövetben (B) 24-96 órás 10 mg/l-es Cd^{2+} -kezelést követően.

Az egyes gének esetében a β -aktin-hoz viszonyított mRNS szinteket ábrázoltuk. A szignifikáns változásokat * jelöli a kontrollhoz (K), Δ az előző kezelési ponthoz viszonyítva ($P < 0,05$).

Agyban az *mtf-1.1* mRNS szint nagymértékben lecsökkent Cd^{2+} hatására; már 24 óra eltelte után 40 %-os csökkenést tapasztaltunk. A legalacsonyabb szintet a 96 órás kezelés után mértük, itt a kontroll szintnek alig 20 %-át tudtuk kimutatni. Az *mtf-1.1a* variáns esetében 24 óra után 60 %-os, 96 óra után már 85 %-os csökkenést mértünk a kontroll szinthez viszonyítva. Az *mtf-1.2* transzkriptum esetében kisebb mértékű csökkenést láttunk (14.B ábra).

További kísérleteink során párhuzamosan követtük két külön agyrégióban az *mtf-1.1* és *mtf-1.2* mRNS-ek mennyiségi változásait. A szaglőlebenyben mindkét mRNS szint szignifikáns csökkenést mutatott. A legalacsonyabb értékeket 48 órás kezelés után mértük, ekkor az *mtf-1.1* szint legfeljebb 35 %-a volt a kezeletlen állatokban mérhetőnek, az *mtf-1.2*-es transzkriptum nem volt kimutatható mennyiségben jelen (15.A ábra).

A kisagyban az *mtf-1.1* mRNS esetében nem tapasztaltunk szignifikáns csökkenést. Az *mtf-1.2* gén expressziója azonban 24 órás kezelést követően 60%-os csökkenést mutatott. 48 órás inkubálás után, pedig hasonlóan a szaglőlebenyhez, az *mtf-1.2* mRNS nem volt detektálható mennyiségben jelen (15.B ábra).



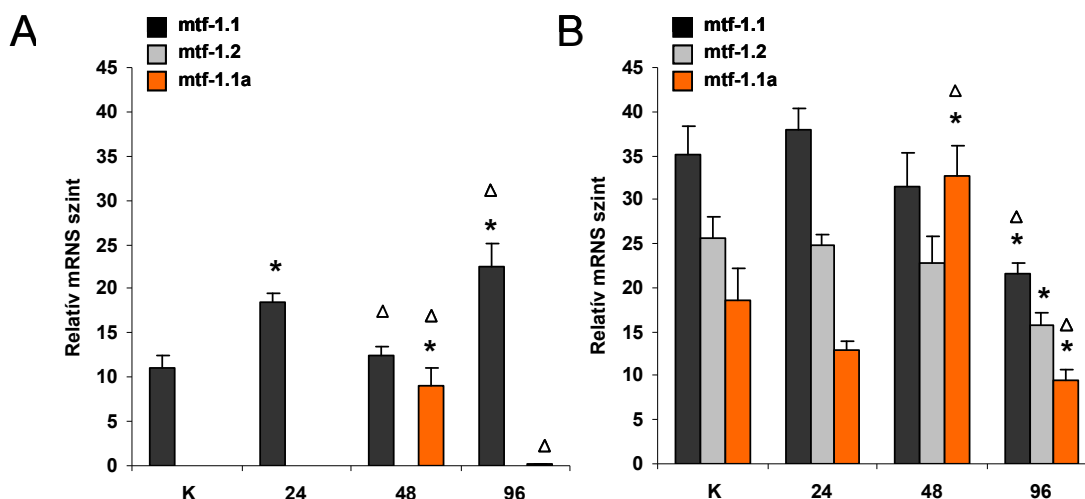
15. ábra: Az *mtf-1* gének expressziójának változása a szaglőlebenyben (A) és a kisagyi régióban (B) 24-96 óras 10 mg/l-es Cd^{2+} -kezelést követően.

Az egyes gének esetében a β -aktin-hoz viszonyított mRNS szinteket ábrázoltuk. A szignifikáns változásokat * jelöli a kontrollhoz (K), Δ az előző kezelési ponthoz viszonyítva ($P < 0,05$).

5.5.3. As^{3+} -kezelés hatása az *mtf-1* gének expressziójára

Májban a 24 órás és a 96 órás 10 mg/l koncentrációjú As^{3+} -kezelés megnövelte az *mtf-1.1* mRNS szintjét (170-200 %). Viszont 48 óránál a kontroll szinthez hasonló értékeket tapasztaltunk. Az *mtf-1.1a* splice-variáns szintje egyetlen pontban volt kimutatható a kezelése során; 48 órás kezelést követően csaknem az *mtf-1.1* mRNS mennyiségével megegyező *mtf-1.1a* mennyiséget detektáltunk. Az *mtf-1.2* transzkriptum mennyisége egyik kezelési időpontban sem volt kimutatható (16.A ábra).

Agyban az *mtf-1.1* és az *mtf-1.2* gének expresszióját az első 48 órában nem befolyásolta szignifikánsan az As^{3+} -kezelés. A splice-variáns mennyisége viszont 48 órás kezelést követően 180 %-os emelkedést mutatott; így az *mtf-1.1a* és az *mtf-1.1* mRNS mennyisége ebben a kísérleti időpontban megegyezett. 96 órás fémterhelést követően mindhárom vizsgált expresszió csökkent, a kontroll szint 55-60%-ára esett vissza (16.B ábra).



16. ábra: Az *mtf-1* gének expressziójának változása máj- (A) és agyszövetben (B) 24-96 órás 10 mg/l-es As^{3+} kezelést követően.

Az egyes gének esetében a β -aktin-hoz viszonyított mRNS szinteket ábrázoltuk. A szignifikáns változásokat * jelöli a kontrollhoz (K), Δ az előző kezelési ponthoz viszonyítva ($P < 0,05$).

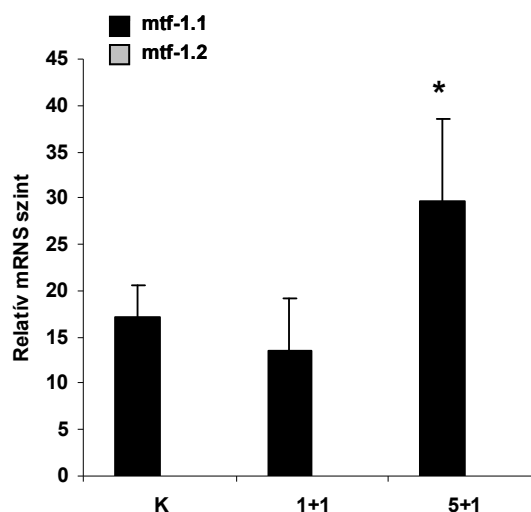
5.5.4. Hirtelen hőmérsékletváltozás hatása az *mtf-1* gének expressziójára

A toxikus nehézfém-kezelések mellett egy fizikai stresszhatás, a hidegsokk hatására bekövetkező változásokat is vizsgáltuk az agy két különböző régiójában. 1 illetve 5 órán át 7 °C-os hőmérséklet csökkenésnek tettük ki a halakat, majd 1 órára visszahelyeztük őket az inkubációs hőmérsékletre (1+1; 5+1).

Májban az *mtf-1.1* transzkriptum mennyisége szignifikáns növekedést 5+1 órás kezelést követően mutatott. Az *mtf-1.2* mRNS egyik kezelési pontban sem volt kimutatható mennyiségben jelen (17. ábra).

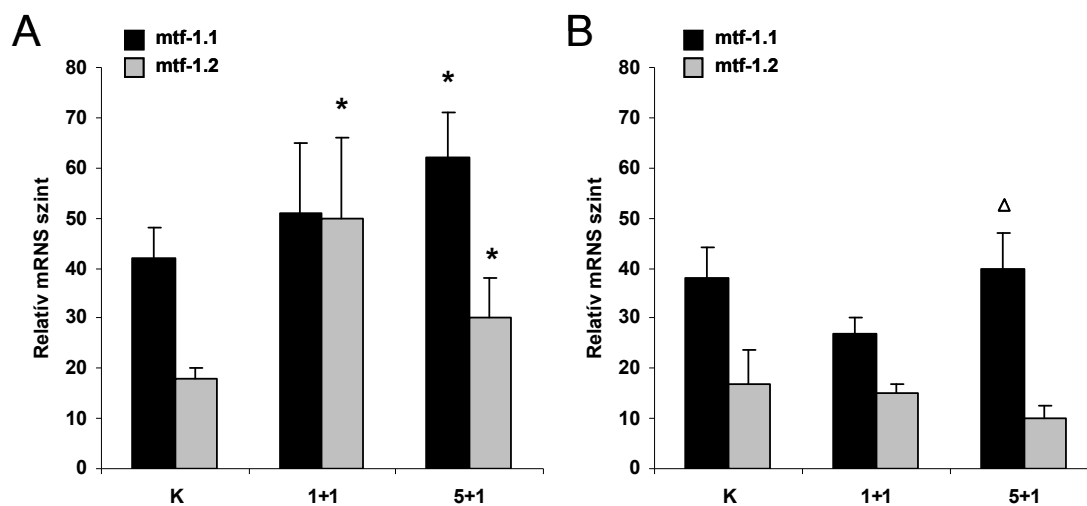
Szaglőlebensben mindkét *mtf-1* gén expressziója növekedett. Az *mtf-1.1* mRNS szintje 5+1 órás hidegsokkot követően a kontroll szint 150 %-ára emelkedett, ezzel szemben az *mtf-1.2* expressziója az 1+1 kezelés után volt a legmagasabb, a kontroll szint háromszorosa (18.A ábra).

A kisagyban egyik gén expressziójában sem tapasztaltunk szignifikáns változást hőmérséklet-csökkenést követően (18.B ábra).



17. ábra: Az *mtf-1* gének expressziójának változása hirtelen hőmérsékletváltozást követően májban.

Az egyes gének esetében a β -aktin-hoz viszonyított mRNS szinteket ábrázoltuk. A szignifikáns változásokat * jelöli a kontrollhoz (K) viszonyítva ($P < 0,05$).



18. ábra: Az *mtf-1* gének expressziójának változása hirtelen hőmérsékletváltozást követően a szaglőleányban (A) és a kisagyi régióban (B).

Az egyes gének esetében a β -aktin-hoz viszonyított mRNS szinteket ábrázoltuk. A szignifikáns változásokat * jelöli a kontrollhoz (K), Δ az előző kezelési ponthoz viszonyítva ($P < 0,05$).

5.6. Ponty *gpx* gének expressziója

5.6.1. A *gpx* gének szövetspecifikus expressziója

Kezeletlen állatokban a legmagasabb *gpx1* mRNS szinteket szívben tapasztaltuk. Ennek csaknem 60 %-a volt detektálható vesében, közel 50 %-a az izomban és az agyban. A legalacsonyabb szintet (a szív mRNS mennyiségének egyharmadát) májban mértük.

Ezzel ellentétben a legmagasabb *gpx4a* mRNS szintek éppen a májszövetben mutathatók ki. A májra jellemző mennyiségnek az agyban 40 %-a, izomban, vesében és szívben a 20-25 %-a volt mérhető. Májban a *gpx4a* expressziója csaknem tízszerese volt a *gpx1*-ének.

A *gpx4b* mRNS szintek minden szövetben alacsonyabbak voltak, mint a másik két *gpx* gén szintjei. Az öt vizsgált szövet közül négyben közel azonos *gpx4b* mRNS szinteket detektáltunk, azonban vesében a *gpx4b* nem volt kimutatható mennyiségben jelen. A *gpx4a/gpx4b* egymáshoz viszonyított aránya májban volt a legmagasabb, 20:1; míg szívben a legalacsonyabb, 5:1 (19.A és C ábra).

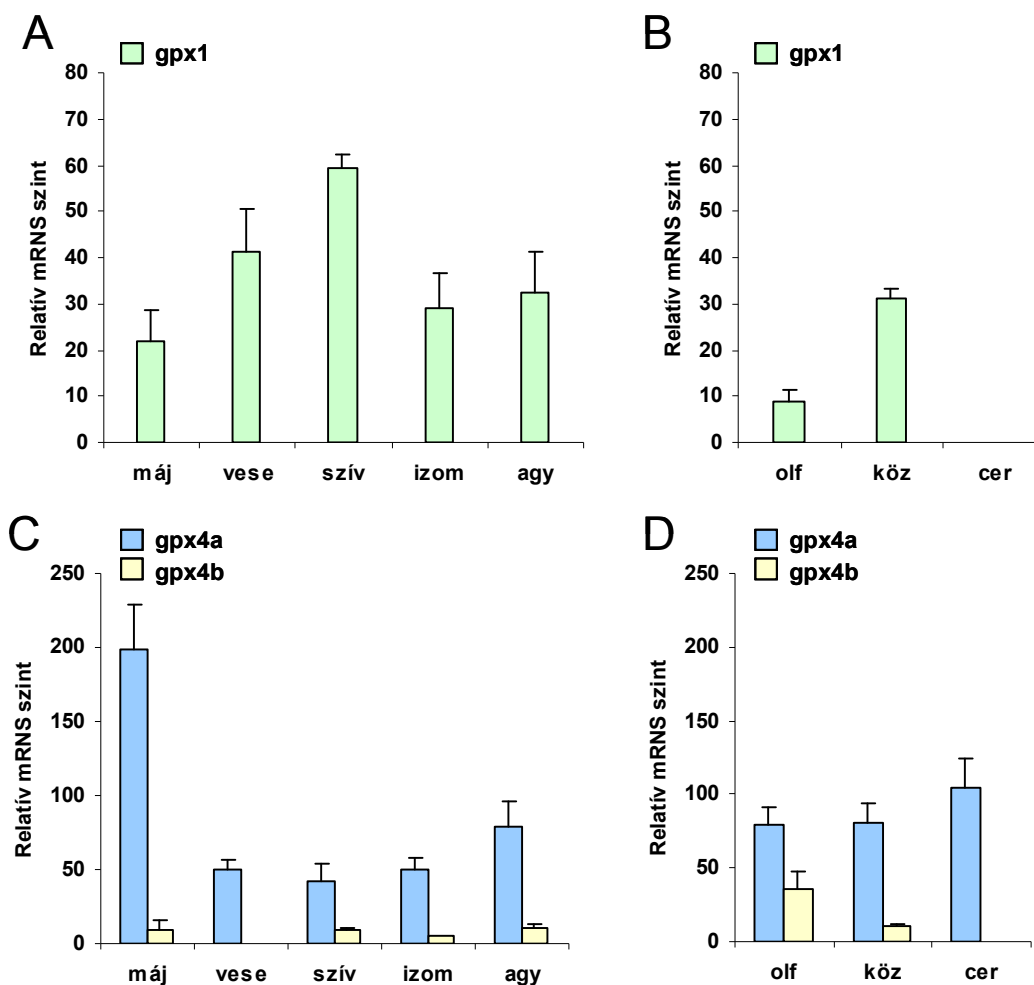
Három különböző, izolált agyrégióban is vizsgáltuk a gének expresszióját. Mindhárom régióban a *gpx4a* gén expressziója volt a legmagasabb. A kisagyi régióban mértük a legmagasabb szintet, a másik két agyrégióban nagyjából a kisagyi expresszió 80 %-át mutattuk ki. A *gpx1* és a *gpx4b* mRNS szintek nem voltak detektálható mennyiségben jelen a kisagyban. A másik két régiót tekintve, a *gpx4b* a szaglőlebenyben, a *gpx1* mRNS szintje a középagyi régióban volt a magasabb, azonban szintjük legfeljebb az adott *gpx4a* szint felének felelt meg (19.B és D ábra).

5.6.2. Cd^{2+} -kezelés hatása a *gpx* gének expressziójára

A 10 mg/l koncentrációjú Cd^{2+} -kezelés hatását a májban és a szaglőlebenyben követtük, abban a két szövetben, ahol a kontroll állatokban a legmagasabb *gpx4a* (máj) illetve *gpx4b* (szaglőlebeny) mRNS szinteket mértük.

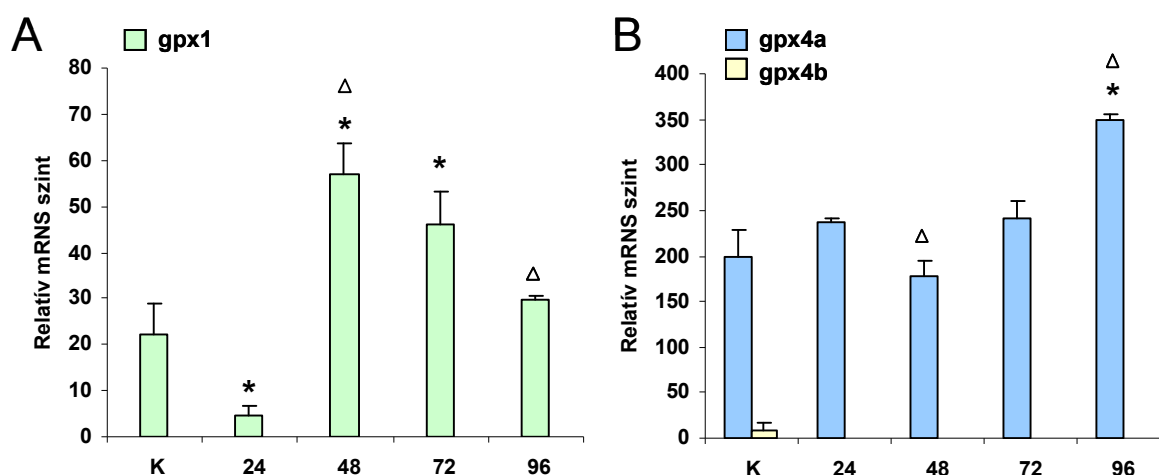
A *gpx1* gén expressziója különböző módon változott a két vizsgált szövetben. Májban a 24 órás kezelés jelentős, 75 %-os gátlást okozott, 48 órát követően pedig egy,

2,5-szeres indukciót tapasztaltuk, amely a hosszabb idejű kezelések során az alapszinthez közeli értékekre esett vissza (20.A ábra). A szaglőlebenyben a 24 órás kezelés okozott csaknem kétszeres *gpx1* expresszió növekedést. A többi kezelési időpontban viszont a kontroll állatokéhoz hasonló szinteket mértünk (21.A ábra).



19. ábra: A *gpx* gének expressziója kezeletlen ponty szövetekben (A és C) és három különböző agyrégióban (B és D); a szaglőlebenyben (olf), a közepagi régióban (köz) és a kisagyban (cer).

Az egyes gének esetében a β -aktin-hoz viszonyított mRNS szinteket ábrázoltuk.



20. ábra: A *gpx1* (A) és a *gpx4* (B) gének expressziójának változása májban 24-96 óras 10 mg/l-es Cd²⁺-kezelést követően.

Az egyes gének esetében a β -aktin-hoz viszonyított mRNS szinteket ábrázoltuk. A szignifikáns változásokat * jelöli a kontrollhoz (K), Δ az előző kezelési ponthoz viszonyítva ($P < 0,05$).

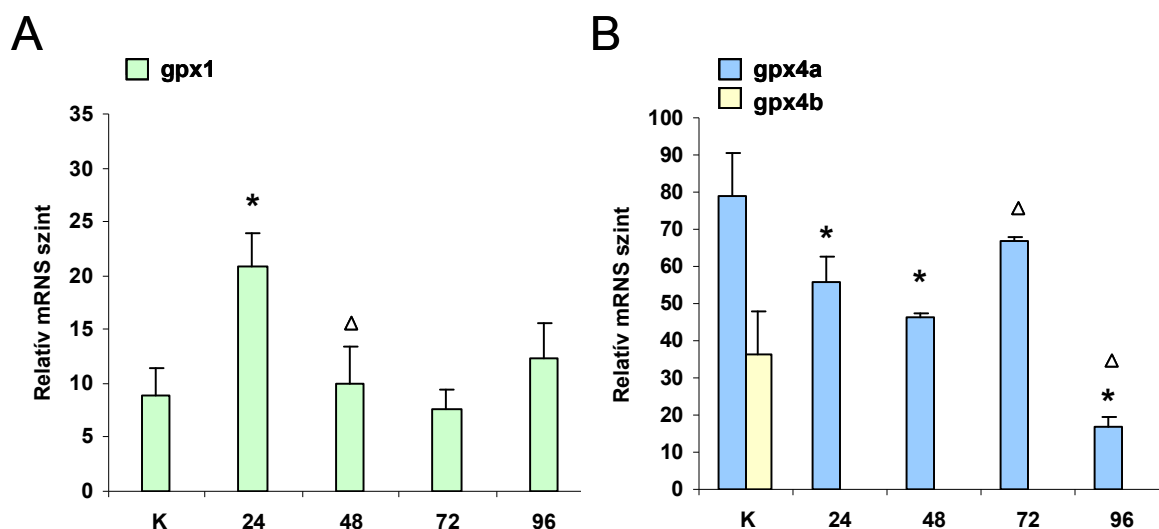
A *gpx4a* expresszióját májszövetben kevésbé befolyásolta a Cd²⁺-kezelés; csupán a 96 óras kezelést követően tapasztaltunk szignifikáns változást, ekkor a kontroll mRNS szint 175 %-át tudtuk kimutatni (20.B ábra). A szaglőlebenyben már a 24 óras kezelés is szignifikánsan csökkentette a *gpx4a* mRNS szinteket. A legnagyobb gátlást 96 óra után tapasztaltuk, ekkor mindössze a kontroll szint 20 %-át tudtuk kimutatni (21.B ábra).

A *gpx4b* gén expresszióját a Cd²⁺-kezelés a vizsgált koncentrációban mindkét szövetben drasztikusan csökkentette. Egyik kezelési időpontban sem volt kimutatható mennyiségben jelen sem a májban, sem az agyszövetben (20.B és 21.B ábra).

5.6.3. Hirtelen hőmérsékletváltozás hatása a *gpx* gének expressziójára

A *gpx* gének expressziójára is megvizsgáltuk az 1 illetve 5 óras 7 °C-os hőmérséklet csökkenés hatásait. Ebben az esetben vizsgáltuk a közvetlenül a hidegsokk hatására és az azt követő 1 óras *recovery* periódus után bekövetkező változásokat is.

A *gpx1* mRNS szint májban 1 órás és 1+1 órás hidegsokkot követően is szignifikáns, 2x-szeres indukciót mutatott, míg az 5 órás kezelések után a kontroll szinthez hasonló értékeket mértünk (22.A ábra). A szaglólebenyben, bár kismértékű változásokat láttunk, de egyik sem mutatott szignifikáns eltérést a kezeletlen állatokhoz képest (23.A ábra)

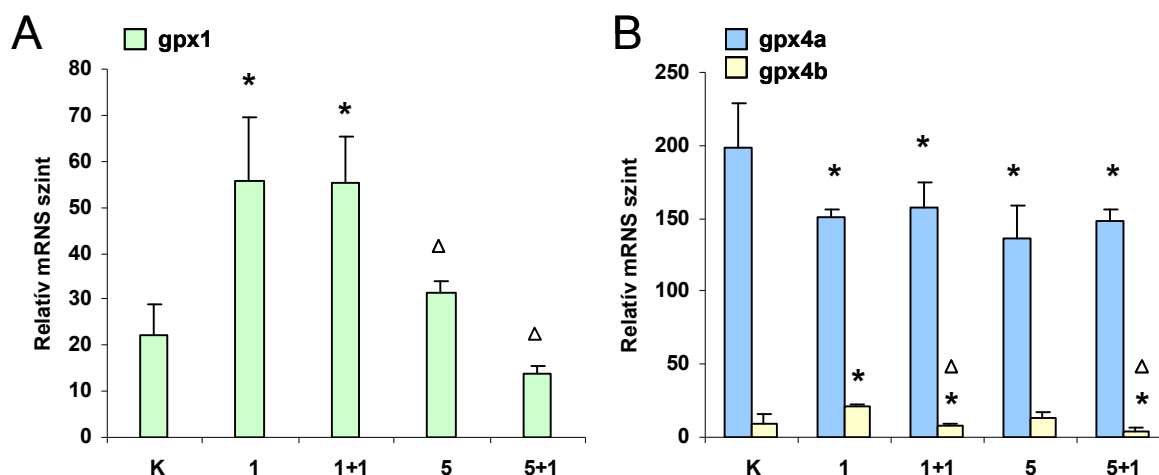


21. ábra: A *gpx1* (A) és a *gpx4* (B) gének expressziójának változása a szaglólebenyben 24-96 órás 10 mg/l-es Cd²⁺-kezelést követően.

Az egyes gének esetében a β -aktin-hoz viszonyított mRNS szinteket ábrázoltuk. A szignifikáns változásokat * jelöli a kontrollhoz (K), Δ az előző kezelési ponthoz viszonyítva ($P < 0,05$).

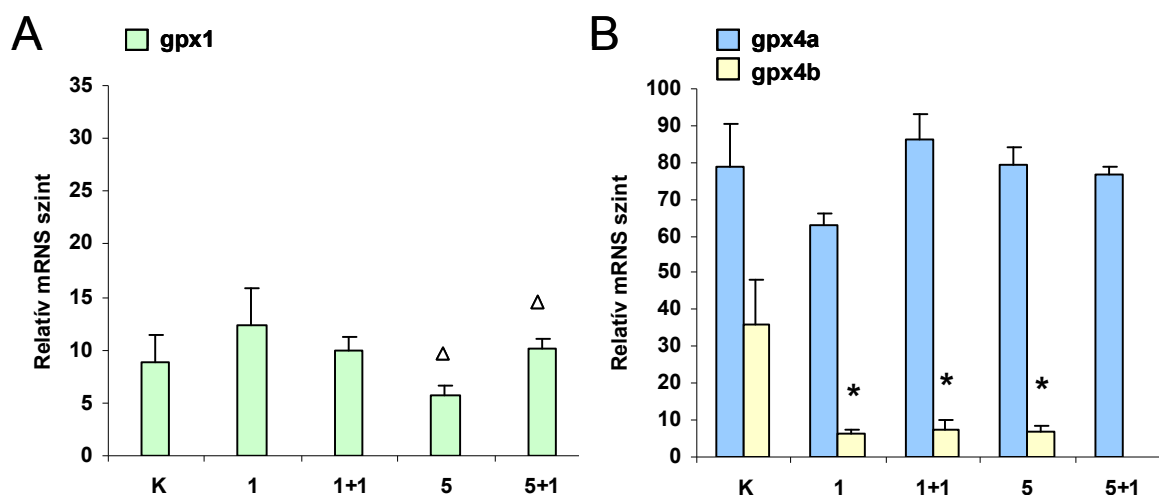
Májban a *gpx4a* mRNS mennyisége minden kísérleti időpontban a kontroll érték 70-75 %-ára csökkent hideg kezelés hatására (22.B ábra). A szaglólebenyben a *gpx4a* gén expressziója nem változott szignifikánsan (23.B ábra).

A *gpx4b* expressziója májban az 1 órás hidegkezelést követően érte el a maximális szintjét, 2,5-szeres indukciót mutatott. A *recovery* periódusok alatt azonban a kontroll szint alá csökkent a *gpx4b* mRNS mennyisége (22.B ábra). A szaglólebenyben minden kezelési pontban drasztikus *gpx4b* mRNS szint csökkenést detektáltunk, legfeljebb a kontroll szint 20 %-át tudtuk kimutatni (23.B ábra).



22. ábra: A *gpx1* (A) és a *gpx4* (B) gének expressziójának változása a májban hirtelen hőmérsékletváltozást követően.

Az egyes gének esetében a β -aktin-hoz viszonyított mRNA szinteket ábrázoltuk. A szignifikáns változásokat * jelöli a kontrollhoz (K), Δ az előző kezelési ponthoz viszonyítva ($P < 0,05$).



23. ábra: A *gpx1* (A) és a *gpx4* (B) gének expressziójának változása a szaglőleiben hirtelen hőmérsékletváltozást követően.

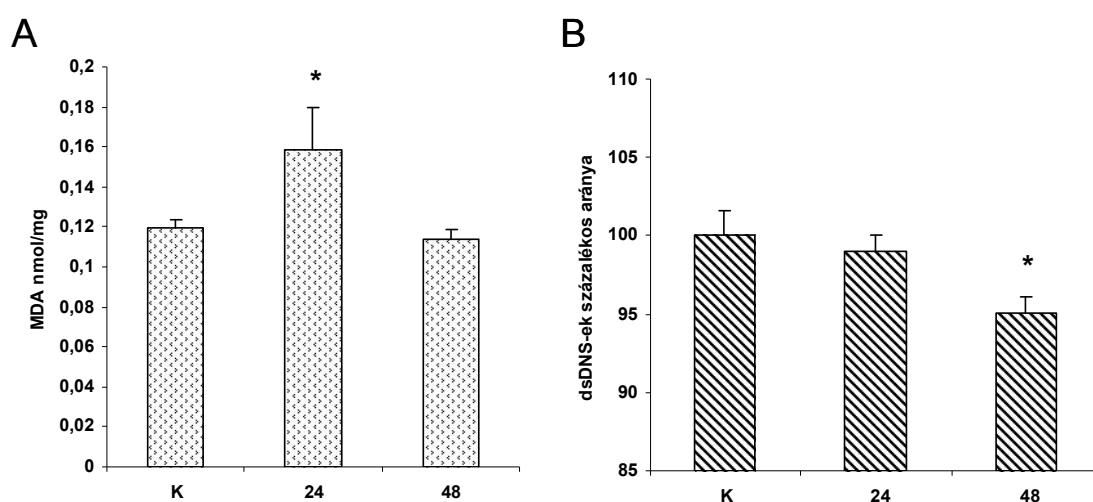
Az egyes gének esetében a β -aktin-hoz viszonyított mRNA szinteket ábrázoltuk. A szignifikáns változásokat * jelöli a kontrollhoz (K), Δ az előző kezelési ponthoz viszonyítva ($P < 0,05$).

5.7. Cd²⁺-kezelés hatása a májszövetben

5.7.1. Májsejtek oxidatív károsodását jellemző paraméterek vizsgálata

Kísérleteink során több szempontból szeretnénk volna vizsgálni a Cd²⁺-terhelés következményeit. Ismert, hogy a nehézfém-kezelések jelentős oxidatív stresszhatásnak tehetik ki a szervezetet.

A lipidperoxidáció mértékének és a DNS-száltörések számának növekedése az oxidatív sejtkárosodás két jellemző paramétere. A 10 mg/l-es koncentrációjú Cd²⁺-kezelt máj mintákban meghatároztuk a lipidperoxidációra utaló MDA koncentrációját illetve az egy- és kétszálú DNS-ek arányát.



24. ábra: A lipidperoxidáció (A) és a DNS-károsodás változása (B) 24-48 órás 10 mg/l Cd²⁺-kezelés hatására májban.

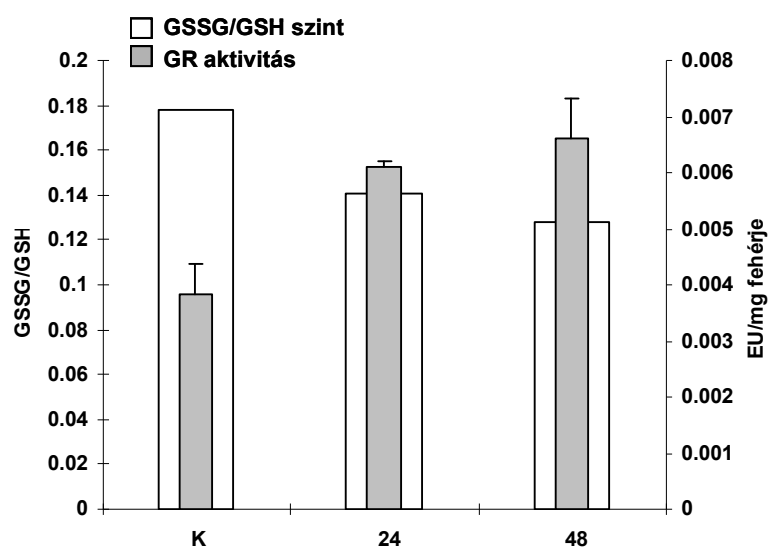
A lipidperoxidáció egyenesen arányos az MDA mennyiségével. A DNS-károsodásra az egy- és kétszálú DNS-ek egymáshoz viszonyított arányából következtethetünk. A szignifikáns változásokat * jelöli a kontrollhoz (K) viszonyítva ($P < 0,05$).

Az MDA mennyisége 24 órás kezelést követően szignifikánsan megnőtt, azonban 48 órás kezelés után a kontrollhoz hasonló szintre csökkent vissza (24.A ábra). A egy- és kétszálú DNS-ek egymáshoz viszonyított arányának csökkenése a DNS-törések számának növekedését mutatja. 48 órás Cd²⁺-kezelést követően szignifikáns, 5 %-os csökkenést tapasztaltunk (24.B ábra).

5.7.2. Májsejtek glutation homeosztázisának vizsgálata

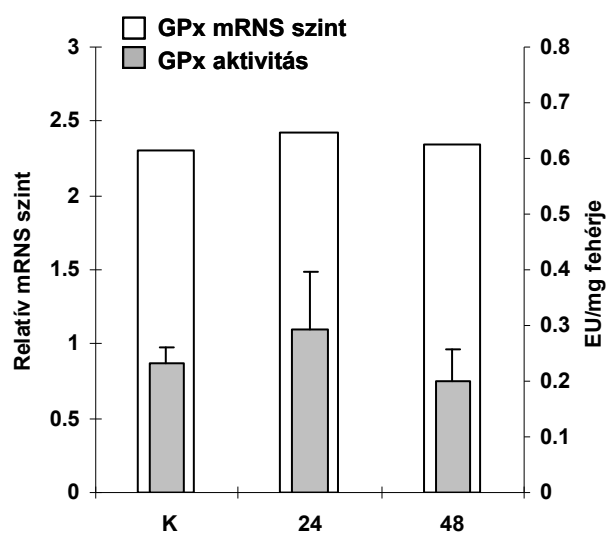
Az oxidatív stressz hatására a sejtekben lezajló változások egy másik jellemző paramétere a sejtek glutation homeosztázisának változása. Míg a GPx-ok a működésük során kosubsztrátként GSH-t oxidálnak, ezáltal a GSSG mennyiségét növelik, a GR enzim a GSSG visszaredukálásával biztosítja a glutation-ciklus fenntartását.

A Cd^{2+} -mal kezelt pontyok májszövetében a GSSG/GSH arány 48 órás kezelést követően csaknem háromnegyedére esik vissza. A GSSG mennyisége kis mértékben csökken, de a redukált GSH mennyisége szignifikáns növekedést mutat. A GR aktivitása 24 és 48 órás kezelést követően is 35-40 %-os növekedést mutat (25. ábra).



25. ábra: A redukált és oxidált GSH arányának és a GR enzim aktivitásának változása 24-48 órás 10 mg/l Cd^{2+} -kezelés hatására májban.

További kísérleteink során követtük a GPx enzimek aktivitásának változását Cd^{2+} -kezelést követően. Bár nem tudtunk szignifikáns változásokat kimutatni, de 24 órás Cd^{2+} -kezelést követően mind az össz-gpx (*gpx1* + *gpx4a* + *gpx4b*) mRNS szint, mind az össz-GPx enzimaktivitás enyhe indukciót mutatott (26. ábra).



26. ábra: A májsejtekben mérhető össz-*gpx* (*gpx1* + *gpx4a* + *gpx4b*) mRNS szint és GPx aktivitás változása 24-48 órás Cd^{2+} -kezelést követően.

6. EREDMÉNYEINK ÖSSZEFOGLALÁSA és MEGBESZÉLÉSE

A nehézfém-szennyezés a környezetvédelem még napjainkban is nagy aktualitással bíró problémája; különösen igaz ez folyó-, és állóvizeink, illetve a bennük, a vízzel szoros kapcsolatban élő élőlények szemszögéből. Ráadásul a nehézfémek felezési ideje rendkívül hosszú; Cd^{2+} -expozíciót követően 10-30 év, ezért nehézfém-terhelés esetén a hosszantartó toxicitással is számolnunk kell.

Az elmúlt években munkacsoportunk egyik fő célja volt minél több, a stresszválaszadásban szerepet játszó géncsalád tagjainak azonosítása és szerepének vizsgálata különböző halfajokban. A dolgozatban leírt kísérleteket ponttyal végeztük. A ponty egy gazdaságilag is nagy jelentőséggel bíró halfaj. Erről a fajról viszonylag kevés génexpresszióra vonatkozó információ található az irodalomban. A dolgozatban leírt munkánk során két géncsalád, az *mtf-1* transzkripció faktor és a *gpx* család több tagját vizsgáltunk. Jelenlegi ismereteink szerint mindkét vizsgált család nélkülözhetetlen tagja a Cd^{2+} hatására aktiválódó stresszválasz útvonalainak (Wimmer és mtsi., 2005).

Régóta ismert, hogy a MT azon kevés fehérjék egyike, mely denaturálódás nélkül képes a Cd^{2+} megkötésére (Suzuki, 1992). A MT-ek expressziója elsősorban transzkripcionális szinten szabályozódik, szabályzásának fiziológias és stressz-indukált körülmények között is nélkülözhetetlen eleme az MTF-1 transzkripció faktor.

A nehézfémek által kiváltott stresszreakciók másik csoportja a glutationokhoz kapcsolódik. A redukált GSH szabad SH-csoportja révén könnyen megköti a Cd^{2+} -ot, ezáltal bizonyos mértékig védi a fehérjéket a denaturálódástól. Emellett a GSH-t koszubsztrátként használva egyes antioxidáns enzimek, mint a GPx család tagjai, képesek redukálni az oxidatív stressz hatására fokozottan képződő H_2O_2 -ot és egyes szerves lipidperoxidokat.

Munkánk eredményei nagyban hozzájárulhatnak a halak hatékony védekező rendszerének részletesebb megismeréséhez.

6.1. MTF-1

Kísérleteink során sikeresen izoláltuk két MTF-1 transzkripció faktor génjét (*mtf-1.1* és *mtf-1.2*) egy ugyanazon fajból, mely példa nélküli az irodalomban. Emellett vizsgáltuk a két gén expressziós változásait nehézfém-kezelések illetve hirtelen hőmérséklet-változást követően.

A szekvencia-analízis vizsgálatok eredményei alapján a két ponty *mtf-1* gén szekvenciája 98 %-ban azonos egymással. A Zn-finger DNS-kötő doméneket kódoló szakaszok megegyeznek egymással, a nukleotid különbségek kizárólag a C-terminális transzaktivációs doméneket kódoló régiókon találhatóak.

A ponty *mtf-1* géneket összehasonlítva a GenBank-ban megtalálható *mtf-1* szekvenciákkal, mindkét általunk azonosított ponty gén a zebradánió *mtf-1* génjéhez mutatja a legnagyobb hasonlóságot. Kísérleteink ideje alatt a GenBank adatbázisába bekerült egy újabb ponty *mtf-1* szekvencia (Muylle, Belgium). Ezt a szekvenciát összehasonlítva az általunk azonosított ponty *mtf-1* génekkel, a DNS-kötő doméneket kódoló régiók hasonlósága 95 %-os, azonban a transzaktivációs doméneket kódoló részek csak 62-63 %-ban azonosak egymással. A belgiumi és a magyar pontyok *mtf-1* szekvenciái közötti jelentős eltérés okai lehetnek a több évszázados tenyésztés következtében kialakult számos pontyfajta közti fajtakülönbségek, a földrajzi izoláció illetve a ponty tetraploid jellege is. De figyelembe kell vennünk azt is, hogy Muylle és munkatársai *epithelioma papulosum cyprini* (EPC) sejtvonalból azonosították a harmadik *mtf-1* szekvenciát. Ezt a sejtvonalat a ponty epidermisz herpesz vírus által indukált abnormális növekedésű sejtjei alkotják (Fijan és mtsi., 1983). Mi a kísérleteink során az *mtf-1* gének azonosításához kifejlett pontyokból izolált máj- és agymintákat használtunk. Azért, hogy ezt a harmadik *mtf-1* szekvenciát is vizsgálhassuk, a GenBank-ban elhelyezett szekvencia információk alapján specifikus primereket terveztünk. Felhasználásukkal ponty genomiális DNS-ből, illetve máj, vese, bőr és agyszövetből preparált cDNS mintáinkból próbáltuk felamplifikálni az általunk még nem azonosított *mtf-1* szekvenciát, ezirányú kísérleteink azonban nem jártak sikerrel.

További kísérleteink során a ponty *mtf-1.1* és *mtf-1.2* gén azonosítása mellett izoláltuk az *mtf-1.1 splice*-variánsát is (*mtf-1.1a*). A *splice*-variáns a szekvencia-

analízis alapján 103 nukleotiddal rövidebb, mint az *mtf-1*. A japán gömbhal ismert genomiális *mtf-1* szekvenciájával összehasonlítva a ponty *mtf-1.1a* szekvenciát, a hetedik exon kivágódása valószínűsíthető. A deléciónak az MTF-1.1a fehérje szekvenciájában egy *frame shift* alakul ki, mely megváltoztatja a fehérje C-terminális aminosav-összetételét. Az N-terminális domének azonosak az MTF-1.1 fehérjével, így az izoforma feltételezhetően képes kötődni a target gén promóterében található MRE szekvenciákhoz, de a transzaktivációs domének hiánya miatt az eredeti formájában nem képes ellátni a funkcióját. Az MTF-1.1a izoforma C-terminálisán nagyszámú leucin és más egyéb hidrofób aminosav található meg, melyek periodicitása miatt feltételezhető egy leucin-zipperhez hasonló fehérje-kötő domén kialakulása.

Számos példa található az irodalomban, hogy egy transzkripciósfaktor az alternatív *splicing* során elveszti transzaktivációs doménjeit. Ilyen példa a STAT3 transzkripciósfaktor, mely egyes citokinek, növekedési faktorok, illetve a MT-ek expresszióját is szabályozza. A STAT3 β szekvenciájában egy deléciónak az MTF-1.1a fehérje szekvenciájában egy *frame shift* a fehérjeszintézis korai terminációját, és emiatt a transzaktivációs domén teljes hiányát okozza. A STAT3 β hatásos negatív regulátora a STAT3 közvetítette génaktivációnak, mivel az ép STAT3 fehérjével kompetícióban kötődik a target gén promóterrégiójához, de az aktiváló domén hiánya miatt nem képes indukálni azok expresszióját (Caldenhoven és mtsi., 1996).

Emlősök esetében egyelőre csak feltételezik MTF-1 izoformák jelenlétét (LaRoche és mtsi., 2001). Azonban több halfajból áll rendelkezésünkre *mtf-1 splice*-variánsokról a GenBank-ban elhelyezett szekvencia információ. Szivárványos pisztrángból (*Oncorhynchus mykiss*) 4 variáns szekvenciája ismert, melyek közös jellemzője, hogy a C-terminális transzaktivációs doménből egy vagy több szakasz hiányzik, ezeknél azonban nem alakult ki *frame shift*. Egy tilápia fajtából (*Oreochromis aureus* \times *O. niloticus*) is izoláltak *mtf-1* variánst, esetében a teljes transzaktivációért felelős rész és a hatodik Zn-finger domén is hiányzik.

Az MTF-1 a Zn-homeosztázis egyik legismertebb szabályzó faktora magasabbrendű eukariótákban. Kutatásaink kezdetén mégis nagyon kevés adat állt rendelkezésünkre az irodalomban az *mtf-1* expressziójáról. Elsősorban az MTF-1 fehérje poszttranszlációs szabályozhatóságát (Smirnova és mtsi., 2000; Saydam és mtsi., 2001; 2002) és target génjei transzkripcióját tanulmányozták (Hermesz és mtsi., 2001;

Lichtlen és mtsi., 2001; Muylle és mtsi., 2006; Choi és mtsi., 2007). Az eddigi egyetlen *mtf-1* alapexpresszió vizsgálat során Auf der Maur és munkatársai (2000) Northern hibridizációval nem tudtak különbségeket kimutatni az egyes rágcsló szövetek között (máj, vese, szív, izom, tüdő, lép, agy). Egy másik kutatócsoport sejt kultúrákon vizsgálta Northern hibridizációval a gén expressziójában bekövetkező változásokat, de sem Cd^{2+} , sem H_2O_2 -kezelés hatására nem tudtak transzkripcionális változásokat kimutatni (Bi és mtsi., 2006).

Az általunk végzett RT-PCR vizsgálatok eredménye az első, mely az *mtf-1* gén(ek) szövetspecifikus expresszióját és indukálhatóságát bizonyítja (3. táblázat). Cheuk és mtsi. (2008) zebradánió sejt vonalakban velünk párhuzamosan végzett vizsgálatai szintén alátámasztották az *mtf-1* gén transzkripcionális szintű szabályozását. Farokuszonyból és májból származó sejt vonalakban Cd^{2+} - és As^{3+} -kezelést követően is szövet-, és fém-specifikus expressziós változásokat mutattak ki.

In vivo kísérleteink során ponty májban, a mérgeztelenítés egyik legfontosabb szervében, ahol a MT gének expressziója a legnagyobb indukálhatóságot mutatta (Hermesz és mtsi., 2001; 2002), az *mtf-1.1* alapexpressziója a legalacsonyabb volt az általunk vizsgált szövetek közül, és emellett sem az *mtf-1.2*, sem az *mtf-1.1a* splice-variáns nem volt kimutatható. A fém-kezeléseket követően is egy legfeljebb kétszeres *mtf-1.1* indukciót tudtunk kimutatni májban.

Ismert, hogy az idegrendszer sejtjeire rendkívül magas Zn^{2+} -koncentráció jellemző, mivel a fehérjékben játszott szerkezeti szerepe mellett a Zn^{2+} másodlagos intercelluláris szignál messenger is (Choi és Koh, 1998). Mivel az MTF-1 szerepet játszik a sejtek Zn^{2+} -homeosztázisának fenntartásában, kutatásaink során külön figyelmet fordítottunk az agyban, illetve a különböző agyrégiókban az *mtf-1* génexpresszió szabályozásra. Az *mtf-1.2* mRNS-t kontroll és kezelt állatok esetében is egyedül az agyszövetben tudtuk kimutatni. Kezeletlen állatokban az *mtf-1.1* és *mtf-1.1a* expresszió agyszövetben a legmagasabb. Cd^{2+} -kezelést követően mindhárom vizsgált transzkriptum szintje csökkent az agyban.

A nehézfém-kezelések mellett elsőként vizsgáltuk egy fizikai stressz hatás, a hirtelen hidegsokk *mtf-1* transzkripcióra gyakorolt hatását. A hipotermiáról egyrészt tudjuk, hogy jelentősen befolyásolja a MT gének expresszióját (Hermesz és mtsi., 2001; Ali és mtsi., 2009), másrészt a sejtek Zn^{2+} -háztartását is megváltoztatja szövetspecifikus

módon (Carrasco és mtsi., 1999; Izgüt-Uysal és mtsi., 2000; Hermes és mtsi., nem publikált eredmények). A májban és az agyban a hidegsokk a Zn^{2+} -koncentráció nagymértékű, de ellentétes irányú változását okozza. Az MTF-1 transzkripciós faktor fontos szerepet játszik a sejtek Zn^{2+} -homeosztázisában résztvevő fehérjék (MT, ZnT1) expressziójának szabályzásában. Az *mtf-1* gén expressziója mindkét szövetben indukciót mutat hirtelen hőmérséklet-csökkenés hatására, ami az MTF-1 faktor megnövekedett szerepére utal.

6.2. GPx

A GPx régóta ismert antioxidáns hatású enzimes család, melynek tagjai az oxidatív stressz hatására a sejtekben keletkező H_2O_2 -t és egyes szerves hidroperoxidokat képesek semlegesíteni, redukált GSH-t használva koszubsztrátként. Számos publikáció jelent meg a GPx enzimaktivitás és a fehérjeszintek mennyiségi vizsgálatairól, azonban csak néhány kísérlet során végeztek transzkripcionális szintű vizsgálatokat (Thimmalapura és mtsi., 1995; Thisse és mtsi., 2003; Kang és mtsi., 2004; Choi és mtsi., 2007). Pontyból elsőként mi azonosítottuk a *gpx* család tagjait (*gpx1*, *gpx4a* és *gpx4b*) és ezzel párhuzamosan vizsgáltuk az expressziós változásait Cd^{2+} -, illetve hidegkezeléseket követően (3. táblázat).

A *gpx4* géncsalád egyik jellegzetessége, hogy amíg emlősökben, madarakban, és számos halfajban egy-egy *gpx4* gén azonosítható, egyes halfajokban (zebradánió, lazac, aranyhal) két *gpx4* gén (*gpx4a* és *gpx4b*) mutatható ki. Hozzájuk hasonlóan pontyból is két *gpx4* gén volt izolálható. A ponty *gpx4a* és *gpx4b* gének 79 %-ban azonosak egymással, és mindkét gén a zebradánió ortológ génjéhez mutatja a legnagyobb hasonlóságot (*gpx4a* 89 %; *gpx4b* 92 %).

Thisse és mtsi. (2003) vizsgálataik során zebradánió embriókból két *gpx1* gént (*gpx1a* és *gpx1b*) tudtak izolálni, azonban nincs más példa sem az irodalomban, sem a GenBank szekvenciái között arra, hogy két *gpx1* gént azonosítottak volna ugyanabban a fajban. Pontyban egy *gpx1* gén azonosítása történt meg, mely a pontyfélék közé tartozó amur *gpx1* szekvenciájához mutatja a legnagyobb (91 %) hasonlóságot. Azok a GPx család tagjaira jellemző aminosavak, melyek a fehérjék aktív centrumának kialakításában vesznek részt, és konstitutívan megtalálhatók minden korábban ismert

fajban (Erdélyi és mtsi., 1999; 2000), a ponty GPx4 és GPx1 fehérjékre is specifikusak.

Az általunk izolált ponty *gpx1* és *gpx4* illetve a GenBank-ban elhelyezett *gpx* szekvenciák felhasználásával elkészítettünk egy törzsfát, amely egy olyan filogenetikai elemzés eredményeit ábrázolja, mely a halaktól az emlősökig terjedő széles spektrumban vizsgálta a jelenleg ismert *gpx*-ok filogenetikai viszonyait.

Több halfajból, köztük *Cyprinidae* családba tartozó fajokból is ismert a *gpx1* gén expressziója. Fehér busával (Li és mtsi., 2007) és aranyhállal (Choi és mtsi., 2007) végzett kísérletek során májban mérték a legmagasabb *gpx1* expressziót, emellett a *Salmonidae* családba tartozó sebes pisztráng (*Salmo trutta*) májában a vesére jellemző *gpx* szint közel 200-szorosa volt mérhető (Hansen és mtsi., 2006). Az irodalmi adatokkal ellentétben, ponty májban a *gpx1* transzkriptum az általunk vizsgált szövetek közül a legalacsonyabb mennyiségben volt jelen.

Kezeletlen és Cd²⁺-mal kezelt aranyhalak agyában egyáltalán nem tudtak *gpx1* expressziót detektálni (Choi és mtsi., 2007). A kontroll pontyok agyának bizonyos régióiban azonban a májban mért *gpx1* értékek közel kétszerese volt kimutatható.

Patkányoknál a tesztiszben mérhető a legnagyobb *gpx4* mRNS szint, mivel a spermiumok érésében is nagy szerepet játszik a *gpx4*, a többi szövet közül vesében mérték a legnagyobb értékeket, ezt követi a szív, az agy és a máj (Thimmalapura és mtsi., 1995). A *gpx4* gének expressziós mintázatáról felnőtt halakban nincsenek irodalmi adatok. Zebradánió embrionális eredmények alapján ismert, hogy májszövetben mindkét gén (*gpx4a*, *gpx4b*) expresszálódik, de a fejlődő agyrégiókban csak a *gpx4b* mRNS szint mutatható ki (Thisse és mtsi., 2003). A ponty *gpx4a* expressziója májban, míg a *gpx4b*-é a szaglőlebenyben volt a legmagasabb, mely hasonlít a zebradániókban mért mintázathoz. Ponty májban a *gpx4a/gpx4b* arány különösen magas, csaknem 20:1. Tekintettel arra, hogy a *gpx4a* mennyisége közel tízszerese a *gpx1*-nek ponty májban, az irodalmi adatok hiánya mellett is feltételezhetjük, hogy a *gpx4a*-nak fontos szerepe lehet ebben a szövetben fiziológias körülmények között. Ismert, hogy a GPx4 fehérjék a H₂O₂ mellett képesek redukálni egyes lipid-hidroperoxidokat, a koleszterint és a koleszterol-észtereket is (Maiorino és mtsi., 1991). Tonhal esetében is májban a *gpx4* expressziója magasabb, 1,6-szorosa a *gpx1* mennyiségének (Thompson és mtsi., 2010), azonban patkányok májában a *gpx1* mRNS szintek és az enzim aktivitása is többszöre a *gpx4* értékeknek (Weiss Sachdev és

Sunde, 2001).

Cd^{2+} -terhelést és hidegkezelést követően stressz-, idő-, és szövetspecifikus változásokat detektáltunk a *gpx* gének expressziójában. A *gpx1* gén indukcióját tapasztalhattuk fémterhelés hatásra bizonyos időpontokban májban és szaglőlebensben is. Adataink hasonlítanak egy osztriga faj (*Crassostrea gigas*) eredményeihez; *gpx* expresszió növekedést detektáltak 3 napos, viszonylag alacsony koncentrációjú Cd^{2+} -kezelést követően (Jo és mtsi., 2008). Halakban kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre; az aranyhalban Cd^{2+} -kezelést követően már 12 óra elteltével sem májban, sem vesében, sem agyban nem tudtak *gpx1* transzkripciót kimutatni (Choi és mtsi., 2007).

A *gpx4* gének esetében nincs összevethető irodalmi példa sem a Cd^{2+} -kezelések, sem a fizikai stresszhatásra adott válaszok esetében. A *gpx4a* gén esetében szövet- és stresszspecifikus változásokat láttunk, míg a ponty *gpx4b* mRNS szintek Cd^{2+} -kezeléseket követően nem detektálhatóak egyik vizsgált szövetben sem, és hidegkezeléseket követően is az alapszinthez képest csökkent expressziós értékeket mutattak.

6.3. Cd^{2+} -kezelés hatása a májban

Ismert, hogy a máj a szervezet méregtelenítésének egyik fontos központja, szerepe van az egyes toxinok, szerves vegyületek és a nehézfémek elleni védekezésben is. A Cd^{2+} és más nehézfémek a halak kopolyájának epitéliumán, a bőrön és az emésztő traktuson át jut be a halak szervezetébe (Mzimea et al., 2003), az akkumulációja először a májban, majd a kopolyában és a vesében történik (Firat et al., 2008).

Számos különálló irodalmi adat áll rendelkezésünkre a patkányok és egyes halfajok májában zajló stresszreakciókról Cd^{2+} -kezelést követően. Kísérleteinkkel egy átfogó képet szeretnénk volna nyújtani a Cd^{2+} -kezelés hatásairól ponty májban, ezért követtük több, a nehézfémekkel szembeni védekezésben szerepet játszó gén expresszióját. A Cd^{2+} elleni specifikus védekező mechanizmusok fő elemei a fémkötő MT-ek, és a transzkripciójukat szabályzó MTF-1 fehérjék. A máj méregtelenítésében betöltött szerepüket jól mutatja, hogy a *mt*-ek expressziójának indukciója májban a legmagasabb Cd^{2+} -kezelést követően (Hermesz és mtsi., 2001; Ali és mtsi., 2009;

2010). Az *mtf-1.1* gén expressziója szintén indukciót mutat transzkripcionális szinten, az *mtf-1.2* gén expressziója és az *mtf-1.1a splice*-variáns azonban nem mutatható ki májban.

Azért, hogy pontosabb képet kaphassunk egy viszonylag nagy dózisu Cd^{2+} -kezelés hatására a pontyok májában lezajló változásokról, a stresszgének expressziójának vizsgálata mellett, vizsgáltuk a sejtek károsodására utaló paraméterek és az antioxidáns védekező rendszer néhány kulcsenzimének aktivitás-változásait is. Az irodalomban kevés, a mieinkkel összevethető adat található a Cd^{2+} -kezelés hatására lezajló válaszreakciókról, mivel a legtöbb kísérletet rágszálókkal végezték.

A sejtkárosodás leggyakrabban vizsgált paraméterei közé tartoznak az MDA mennyiségének (lipidperoxidáció) és a DNS szál törések mértékének meghatározása. Irodalmi adatok szerint *in vitro* Cd^{2+} -kezelések során a kétféle károsodás nem korrelál teljes mértékben egymással sem akut, sem krónikus kezelést követően (López-Ortal és mtsi., 1999). *In vivo* patkány kezelések során a lipidperoxidáció már 4 órás Cd^{2+} -kezelést követően is emelkedett értékeket mutatott a májsejtekben (Ikediobi és mtsi., 2004; Amara és mtsi., 2006; Ognjanovic és mtsi., 2008). Rau és mtsi (2004) kutatásai alapján a halak sejtjei érzékenyebbek a lipidperoxidációra, mint a patkány sejtek, melyet a kétértékű fémionok által indukált Fenton-reakciók eltérő mértékével magyaráztak. Ponty májban a 24 órás Cd^{2+} -terhelést követően az MDA koncentráció növekedését detektáltuk, azonban 48 órás kezelést követően az alapszinthez közeli értékeket mértünk. Ennek magyarázata lehet, hogy a ponty májban példátlanul nagy mennyiségben expresszálódik a lipidperoxidok redukálásában szerepet játszó *gpx4*.

A DNS és a DNS-*repair* rendszer sérülésére utaló károsodás az egyszálú DNS-ek számának szignifikáns növekedése, mely ponty májban 48 órás Cd^{2+} -kezelés után figyelhető meg. Ismert, hogy a Cd^{2+} jelentősen befolyásolja a génexpressziót, drasztikus mértékben csökkenti a patkány májsejtek össz-RNS és fehérje tartalmát is (Latinwo és mtsi., 2008). A Cd^{2+} -kezelés DNS károsító hatásairól az irodalomban *in vitro* és *in vivo* patkánykezelések állnak rendelkezésünkre. A Cd^{2+} -kezelés hatására, az egyszálú DNS-ek száma növekedett (Badisa és mtsi., 2007). Azonban Cd^{2+} -terhelés esetén a Zn^{2+} és/vagy Se fokozott jelenléte jótékony hatású; nemcsak a DNS károsodás mértéke, de a májban felhalmozódó Cd^{2+} mennyisége is csökken (Ognjanovic és mtsi., 2008; Haldsrud és Krokje, 2009).

Egy további, sejtkárosodására utaló paraméter a sejtek redukált GSH tartalmának csökkenése, mely megfigyelhető Cd^{2+} -mal kezelt patkányoknál, illetve mind a GR, mind a GPx enzimek aktivitása csökkenést mutat (Ikediobi és mtsi., 2004; Renugadevi és Prabu, 2009). Ezzel szemben mi ponty májban ellentétes irányú változásokat láttunk; a sejtek redukált GSH szintje növekedett Cd^{2+} -kezelést követően, mely a GSH homeosztázisában szerepet játszó enzimek aktivációjára utalhatnak. További kísérleteink, a GR és a GPx enzimek aktivitásainak változásai is hasonló eredményeket mutattak. Pontyban a GR enzim szignifikáns indukcióját tapasztaltunk, mely okozhatja a máj GSSG szintjének csökkenését, így a redukált GSH szint növekedését. Hasonló GR és GPx aktivitásváltozásokat tapasztaltak egy másik halfajon, nilusi tilápián (*Oreochromis niloticus*) végzett Cd^{2+} -kísérletek során is (Almeida és mtsi., 2002).

A	kadmium				arzén		hidegsokk		
	máj	agy	szaglőlebens	kisagy	máj	agy	máj	szaglőlebens	kisagy
mtf-1.1	↑	↓↓	↓	–	↑	↓	↑	↑	–
mtf-1.2	–	↓	↓↓	↓↓	–	↓	–	↑	–
mtf-1.1a	–	↓↓	NV	NV	↑↑↑	↑↓	NV	NV	NV

B	kadmium		hidegsokk	
	máj	szaglőlebens	máj	szaglőlebens
gpx1	↓↑	↑	↑	–
gpx4a	↑	↓	↓	–
gpx4b	↓↓	↓↓	↑↓	↓↓

3. táblázat: Az *mtf-1* (A) és a *gpx* (B) gének expressziójának vizsgálatánál elvégzett kísérletek rövid áttekintése.

A legfelső sorokban a kezelések, a második sorban a vizsgált szövetek láthatók. A táblázatban (↑) jelöli, ha a kezelések hatására a kontroll állatokban mérhető mRNS szintekhez képest növekedést, (↓), ha csökkenést láttunk. (↑↓) jelöli, ha a különböző vizsgált időpontokban eltérő irányú változásokat detektáltunk. (–) jelöli, ha a vizsgált időpontokban nem volt szignifikáns változás. (NV) jelöli az általunk nem vizsgált paramétereket. A nyílak száma az indukció mértékére utal.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Legnagyobb köszönettel témavezetőmnek, **Dr. Hermes Edit**nek tartozom, aki egész életemet döntően meghatározta és folyamatos támogatása, hihetetlen türelme és legfőképpen a kitartása nélkül soha nem jutottam volna idáig. Mindent megtett értem, amit csak tehetett, és én hálás szívvel köszönöm ezt Neki.

Köszönetet mondok a SZTE TTIK Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék korábbi és jelenlegi vezetőinek, Dr. Lehockiné Dr. Simon Máriának és Dr. Boros Imrének, akik lehetőséget biztosítottak kutatómunkám elvégzéséhez.

Külön köszönöm a szakmai segítségét Dr. Kissné Dr. Deér Arankának és Dr. Szöllősiné Dr. Varga Ilonának; a gyakorlati és mindenekelőtt emberi támogatását F. Vadadiné Erzsinek.

Köszönöm a Tanszék minden dolgozójának, korábbi és jelenlegi szakdolgozóinak, Ph.D. hallgatóinak; Khaled Said Alinak, Balla Beátának, Antal Henriettnek, Kovács Veronikának, Jancsó Zsanettnek és Hracskó Zsuzsannának a barátságos, jóhangulatú hétköznapiakat, a segítségüket és a bátorításukat.

Nem utolsó sorban hálával tartozom Anyukámnak, a családomnak és a barátaimnak a támogatásukért, és a sok szeretetért, amit tőlük kaptam.

8. IRODALOMJEGYZÉK

- Ali, K. S.,** Ferencz, A., Deér, A. K., Nemcsók, J., Hermes, E. (2009) Expression of two metallothionein genes in different brain regions of common carp. *Acta. Biol. Hung.* 60(2), 149-158.
- Ali, K. S.,** Ferencz, A., Nemcsók, J., Hermes, E. (2010) Expressions of heat shock and metallothionein genes in the heart of common carp (*Cyprinus carpio*): effects of temperature shock and heavy metal exposure. *Acta. Biol. Hung.* 61(1), 10-23.
- Almeida, J. A.,** Diniz, Y. S., Marquesa, S. F. G., Faine, L. A., Ribasc, B. O., Burneikob, R. C., Novelli, E. L. B. (2002) The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. *Environ. Int.* 27(8), 673-679.
- Amara, S.,** Abdelmelek, H., Garrel, C., Guiraud, P., Douki, T., Ravanat, J. L., Favier, A., Sakly, M., Ben Rhouma, K. (2006) Influence of static magnetic field on cadmium toxicity: study of oxidative stress and DNA damage in rat tissues. *J. Trace. Elem. Med. Biol.* 20(4), 263-269.
- Andrews, G. K.** (1990) Regulation of metallothionein gene expression. *Prog. Food. Nutr. Sci.* 14, 193-258.
- Andrews, G. K.** (2001) Cellular zinc sensors: MTF-1 regulation of gene expression. *Biometals.* 14(3-4), 223-237.
- Arai, M.,** Imai, H., Koumura, T., Yoshida, M., Emoto, K., Umeda, M., Chiba, N., Nakagawa, Y. (1999) Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase plays a major role in preventing oxidative injury to cells. *J. Biol. Chem.* 274, 4924-4933.
- Arai, M.,** Imai, H., Sumi, D., Imanaka, T., Takano, T., Chiba, N., Nakagawa, Y. (1996) Import into mitochondria of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase requires a leader sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 227, 433-439.
- Auf der Maur, A.,** Belser, T., Elgar, G., Georgiev, O., Schaffner, W. (1999) Characterization of the transcription factor MTF-1 from the Japanese pufferfish (*Fugu rubripes*) reveals evolutionary conservation of heavy metal stress response. *Biol. Chem.* 380(2), 175-185.

- Auf der Maur, A.,** Belser, T., Wang, Y., Günes, C., Lichtlen, P., Georgiev, O., Schaffner, W. (2000) Characterization of the mouse gene for the heavy metal-responsive transcription factor MTF-1. *Cell. Stress. Chaperones.* 5(3), 196-206.
- Badisa, V. L.,** Latinwo, L. M., Odewumi, C. O., Ikediobi, C. O., Badisa, R. B., Ayuk-Takem, L. T., Nwoga, J., West, J. (2007) Mechanism of DNA damage by cadmium and interplay of antioxidant enzymes and agents. *Environ. Toxicol.* 22(2), 144-151.
- Balamurugan, K.,** Egli, D., Selvaraj, A., Zhang, B., Georgiev, O., Schaffner, W. (2004) Metal-responsive transcription factor (MTF-1) and heavy metal stress response in *Drosophila* and mammalian cells: a functional comparison. *Biol. Chem.* 385(7), 597-603.
- Berlett, B. S.,** Stadtman, E. R. (1997) Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 272(33), 20313-20316.
- Bi, Y.,** Lin, G. X., Millecchia, L., Ma, Q. (2006) Superinduction of metallothionein I by inhibition of protein synthesis: role of a labile repressor in MTF-1 mediated gene transcription. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 20(2), 57-68.
- Birnboim, H. C.,** Jevcak, J. J. (1981) Fluorimetric method for rapid detection of DNA strand breaks in human white blood cells produced by low doses of radiation. *Cancer Res.* 41(5), 1889-1892.
- Buettner, G. R.,** Jurkiewicz, B. A. (1993) Ascorbate free radical as a marker of oxidative stress: an EPR study. *Free Radic. Biol. Med.* 14, 49-55.
- Caldenhoven, E.,** van Dijk, T. B., Solari, R., Armstrong, J., Raaijmakers, J. A., Lammers, J. W., Koenderman, L., de Groot, R. P. (1996) STAT3beta, a splice variant of transcription factor STAT3, is a dominant negative regulator of transcription. *J. Biol. Chem.* 271(22), 13221-13227.
- Carrasco, J.,** Giralt, M., Molinero, A., Penkowa, M., Moos, T., Hidalgo, J. (1999) Metallothionein (MT)-III: generation of polyclonal antibodies, comparison with MT-I+II in the freeze lesioned rat brain and in a bioassay with astrocytes, and analysis of Alzheimer's disease brains. *J. Neurotrauma.* 16(11), 1115-1129.
- Chen, W. Y.,** John, J. A., Lin, C. H., Chang, C. Y. (2002) Molecular cloning and developmental expression of zinc finger transcription factor MTF-1 gene in zebrafish, *Danio rerio*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291(4), 798-805.

- Chen, X.,** Chu, M., Giedroc, D. P. (1999) MRE-Binding transcription factor-1: weak zinc-binding finger domains 5 and 6 modulate the structure, affinity, and specificity of the metal-response element complex. *Biochem.* 38(39), 12915-12925.
- Chen, X.,** Zhang, B., Harmon, P. M., Schaffner, W., Peterson, D. O., Giedroc, D. P. (2004) A novel cysteine cluster in human metal-responsive transcription factor 1 is required for heavy metal-induced transcriptional activation in vivo. *J. Biol. Chem.* 279(6), 4515-4522.
- Cheuk, W. K.,** Chan, P. C., Chan, K. M. (2008) Cytotoxicities and induction of metallothionein (MT) and metal regulatory element (MRE)-binding transcription factor-1 (MTF-1) messenger RNA levels in the zebrafish (*Danio rerio*) ZFL and SJD cell lines after exposure to various metal ions. *Aquat. Toxicol.* 89(2), 103-112.
- Chiu, D. T.,** Stults, F. H., Tappel, A. L. (1976) Purification and properties of rat lung soluble glutathione peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta.* 445(3), 558-566.
- Choi, C. Y.,** An, K. W., Nelson, E. R., Habibi, H. R. (2007) Cadmium affects the expression of metallothionein (MT) and glutathione peroxidase (GPX) mRNA in goldfish, *Carassius auratus*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 145(4), 595-600.
- Choi, D. W.,** Koh, J. Y. (1998) Zinc and brain injury. *An. Rev. of Neurosci.* 21, 347-375.
- Chrisman, C. L.,** Blacklidge, K. H., Riggs, P. K. (1990) Chromosomes of fish. In: Richard A. McFeely (ed): Domestic animal cytogenetics, Advances in Veterinary Science and Comp. Med. 34. Academic Press Inc. 209-227.
- Chu, F. F.,** Doroshov, J. H., Esworthy, R. S. (1993) Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J. Biol. Chem.* 268, 2571-2576.
- Chung, M. J.,** Walker, P. A., Brown, R. W., Hogstrand, C. (2005) ZINC-mediated gene expression offers protection against H₂O₂-induced cytotoxicity. *Toxicol. Applied. Pharmacol.* 205(3), 225-236.
- Cooke, M. S.,** Evans, M. D., Dizdaroglu, M., Lunec, J. (2003) Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB* 17, 1195-1214.

- Dalton, T. P.,** Solis, W. A., Nebert, D. W., Carvan, M. J. 3rd. (2000) Characterization of the MTF-1 transcription factor from zebrafish and trout cells. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 126(3), 325-335.
- David, L.,** Blum, S., Feldman, M. W., Lavi, U., Hillel, J. (2003) Recent duplication of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) genome as revealed by analyses of microsatellite loci. *Mol. Biol. Evol.* 20(9), 1425-1434.
- Davis, S. R.,** Cousins, R. J. (2000) Metallothionein expression in animals: a physiological perspective on function. *J. Nutr.* 130(5), 1085-1088.
- Dear, T. N.,** Campbell, K., Rabbitts, T. H. (1991) Molecular cloning of putative odorant-binding and odorant-metabolizing proteins. *Biochem.* 30(43), 10376-10382.
- Eller-Jessen, K.,** Crivello, J. F. (1998) Subcutaneous NaAs³⁺ exposure increases metallothionein mRNA and protein expression in juvenile winter flounder. *Aquatic Toxicol.* 42(4), 301-320.
- Erdélyi, M.,** Mézes, M., Virág, Gy. (1999) The role of selenium dependent glutathione peroxidase enzymes in animals. - I. Structure, function and regulation. *Biokémia*, 23, 82-88.
- Erdélyi, M.,** Mézes, M., Virág, Gy. (2000) The role of selenium dependent glutathione peroxidase enzymes in animals. - II. Gene and regulation. *Biokémia* 24(3), 73-77.
- Fijan, N.,** Sulimanović, D., Bearzotti, M., Muzinić, D., Zwillenberg, L. O., Chilmonczyk, S., Vautherot, J. F., de Kinkelin, P. (1983) Some properties of the *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) cell line from carp (*Cyprinus carpio*), *Annales de l'Institut Pasteur. Virologie* 134(2), 207-220.
- Firat, Ö.,** Cigun, H., Aslanyavrusu, S., Kargin, F. (2008) Antioxidant responses and metal accumulation in tissues of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* under Zn, Cd and Zn + Cd exposures. *J. Appl. Toxicol.* 29, 295-301.
- Flohé, L.** (1989) In: *Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine* (Miguel, J., Quintanilha, A. T., Weber, H., Eds.) Vol III (CRC Press, Inc., Boca Raton, FL) pp. 281-286.
- Fridovich, I.** (1989) Superoxide dismutases. An adaptation to paramagnetic gas. *J. Biol. Chem.* 264, 7761-7764.

- Ghyselinck, N. B.,** Jimenez, C., Courty, Y., Dufaure, J. P. (1989) Androgen-dependent messenger RNA(s) related to secretory proteins in the mouse epididymis. *J. Reprod. Fertil.* 85(2), 631-639.
- Giedroc, D. P.,** Chen, X., Apuy, J. L. (2001) Metal responsive element (MRE)-binding transcription factor-1 (MTF-1): structure, function, and regulation. *Antioxid. Redox. Sign.* 3, 577-596.
- Green, C. J.,** Lichtlen, P., Huynh, N. T., Yanovsky, M., Laderoute, K. R., Schaffner, W., Murphy, B. J. (2001) Placenta growth factor gene expression is induced by hypoxia in fibroblasts: a central role for metal transcription factor-1. *Cancer. Res.* 61(6), 2696-2703.
- Gu, Q. P.,** Sun, Y., Ream, L. W., Whanger, P. D. (2000) Selenoprotein W accumulates primarily in primate skeletal muscle, heart, brain and tongue. *Mol. Cell. Biochem.* 204, 49-56.
- Gutteridge, J. M.,** Halliwell, B. (1990) The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends. Biochem. Sci.* 15(4), 129-135.
- Günes, C.,** Heuchel, R., Georgiev, O., Müller, K. H., Lichtlen, P., Blüthmann, H., Marino, S., Aguzzi, A., Schaffner, W. (1998) Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the metal-responsive transcriptional activator MTF-1. *EMBO J.* 17(10), 2846-2854.
- Haldsrud, R.,** Krøkje, A. (2009) Induction of DNA double-strand breaks in the H4IIE cell line exposed to environmentally relevant concentrations of copper, cadmium, and zinc, singly and in combinations. *J. Toxicol. Environ. Health. A.* 72(3-4), 155-163.
- Halliwell, B.** (1991) Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease. *Am. J. Med.* 91, 14-30.
- Halliwell, B.,** Gutteridge, J. M. (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219, 1-14.
- Hansen, B. H.,** Rømme, S., Garmo, Ø. A., Olsvik, P. A., Andersen, R. A. (2006) Antioxidative stress proteins and their gene expression in brown trout (*Salmo trutta*) from three rivers with different heavy metal levels. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 143(3), 263-274.
- Hart, B. A.,** Potts, R. J., Watkin, R. D. (2001) Cadmium adaptation in the lung - a double-edged sword? *Toxicology.* 160(1-3), 65-70. Review.

- Hermesz, E.,** Ábrahám, M., Nemcsók, J. (2001) Tissue-specific expression of two metallothionein genes in common carp during cadmium exposure and temperature shock. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 128(3), 457-465.
- Hermesz, E.,** Gazdag, A. P., Ali, K. S., Nemcsók, J., Ábrahám, M. (2002) Differential regulation of the two metallothionein genes in common carp. *Acta Biol. Hung.* 53(3), 343-350.
- Heuchel, R.,** Radtke, F., Georgiev, O., Stark, G., Aguet, M., Schaffner, W. (1994) The transcription factor MTF-1 is essential for basal and heavy metal-induced metallothionein gene expression. *EMBO J.* 13(12), 2870-2875.
- Ho, Y-S.,** Howard, A. J. (1992) Cloning and characterization of the rat glutathione peroxidase gene. *FEBS-Letters.* 301, 5-9.
- Ikediohi, C. O.,** Badisa, V. L., Ayuk-Takem, L. T., Latinwo, L. M., West, J. (2004) Response of antioxidant enzymes and redox metabolites to cadmium-induced oxidative stress in CRL-1439 normal rat liver cells. *Int. J. Mol. Med.* 14(1), 87-92.
- Imai, H.,** Nakagawa, Y. (2003) Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PhGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Rad. Biol. Med.* 34(2), 145-169.
- Imai, H.,** Sumi, D., Hanamoto, A., Arai, M., Sugiyama, A., Nakagawa, Y. (1995) Molecular cloning and functional expression of a cDNA for rat phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: 3'-untranslated region of the gene is necessary for functional expression. *J. Biochem. (Tokyo)* 118, 1061-1067.
- Izgüt-Uysal, V. N.,** Derin, N., Ağaç, A. (2000) Effect of cold-restraint stress on the distribution of trace elements in rat tissues. *Biol. Trace. Elem. Res.* 78(1-3), 149-155.
- Jarup, L.,** Berglund, M., Elinder, C. G., Nordberg, G., Vahter, M. (1998) Health effects of cadmium exposure - a review of the literature and a risk estimate. *Scand. J. Work. Environ. Health.* 24(1), 1-51.
- Jarup, L.** (2003) Hazards of heavy metal contamination. *Br. Med. Bull.* 68, 167-182.
- Jo, P. G.,** Choi, Y. K., Choi, C. Y. (2008) Cloning and mRNA expression of antioxidant enzymes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in response to cadmium exposure. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 147(4), 460-469.
- Kang, S. G.,** Jeong, H. K., Suh, H. S. (2004) Characterization of a new member of the glutathione peroxidase gene family in *Oryza sativa*. *Mol. Cells.* 17, 23-28.

- Kelner, M. J.,** Montoya, M. A. (1998) Structural organization of the human selenium-dependent phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene (GPX4): chromosomal localization to 19p13.3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249, 53-55.
- Koizumi, S.,** Suzuki, K., Ogra, Y., Yamada, H., Otsuka, F. (1999) Transcriptional activity and regulatory protein binding of metal-responsive elements of the human metallothionein-IIA gene. *Eur. J. Biochem.* 259(3), 635-642.
- Kono, Y.,** Fridovich, I. (1982) Superoxide radical inhibits catalase. *J. Biol. Chem.* 257(10), 5751-5754.
- Konturek, S. J.,** Konturek, P. C., Brzozowski, T., Bubenik, G. A. (2007) Role of melatonin in upper gastrointestinal tract. *J. Physiol. Pharmacol.* 58(6), 23-52.
- Kowalski, J.,** Blaszczyk, J., Petecka, E., Irmanski, R., Kowalczyk, E., Kowalska, E., Ceglinski, T., Pawlicki, L. (2005) Neutrophils superoxide anion generation during carvedilol therapy in patients with stable angina. *Int. J. Cardiol.* 102(3), 397-402.
- Langmade, S. J.,** Ravindra, R., Daniels, P. J., Andrews, G. K. (2000) The transcription factor MTF-1 mediates metal regulation of the mouse ZnT1 gene. *J. Biol. Chem.* 275(44), 34803-34809.
- Larhammar, D.,** Risinger, C. (1994) Molecular genetic aspects of tetraploidy in the common carp (*Cyprinus carpio*). *Mol. Phylogenet. Evol.* 3(1), 59-68.
- LaRochelle, O.,** Stewart, G., Moffatt, P., Tremblay, V., Séguin, C. (2001) Characterization of the mouse metal-regulatory-element-binding proteins, metal element protein-1 and metal regulatory transcription factor-1. *Biochem. J.* 353(3), 591-601.
- Latinwo, L. M.,** Badisa, V. L., Odewumi, C. O., Ikediobi, C. O., Badisa, R. B., Brooks-Walter, A., Lambert, A. T., Nwoga, J. (2008) Comparative evaluation of cytotoxicity of cadmium in rat liver cells cultured in serum-containing medium and commercially available serum-free medium. *Int. J. Mol. Med.* 22(1), 89-94.
- Li, L.,** Xie, P., Li, S., Qiu, T., Guo, L. (2007) Sequential ultrastructural and biochemical changes induced in vivo by the hepatotoxic microcystins in liver of the phytoplanktivorous silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 146(3), 357-367.

- Lichtlen, P.,** Wang, Y., Belser, T., Georgiev, O., Certa, U., Sack, R., Schaffner, W. (2001) Target gene search for the metal-responsive transcription factor MTF-1. *Nucl. Acids. Res.* 29(7), 1514-1523.
- Lichtlen, P.,** Schaffner, W. (2001) Putting its fingers on stressful situations: the heavy metal-regulatory transcription factor MTF-1. *Bioessays.* 23(11), 1010-1017.
- López-Ortal, P.,** Souza, V., Bucio, L., González, E., Gutiérrez-Ruiz, M. C. (1999) DNA damage produced by cadmium in a human fetal hepatic cell line. *Mutat. Res.* 439(2), 301-306.
- Lowry, O. H.,** Rosebrough, E. A., Farr, A. L. (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Maiorino, M.,** Aumann, K. D., Brigelius-Flohe, R., Doria, D., van den Heuvel, J., McCarthy, J., Roveri, A., Ursini, F., Flohe, L. (1998) Probing the presumed catalytic triad of a selenium-containing peroxidase by mutational analysis. *Z. Ernährungswiss.* 37, 118-121.
- Maiorino, M.,** Bosello, V., Ursini, F., Foresta, C., Garolla, A., Scapin, M., Sztajer, H., Flohe, L. (2003) Genetic variations of gpx-4 and male infertility in humans. *Biol. Reprod.* 68(4), 1134-1141.
- Maiorino, M.,** Thomas, J. P., Girotti, A. W., Ursini, F. (1991) Reactivity of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase with membrane and lipoprotein lipid hydroperoxides. *Free Radic. Res. Commun.* 12-13, 131-135.
- McCord, J. M.,** Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244(22), 6049-6055.
- McMurray, C. T.,** Tainer, J. A. (2003) Cancer, cadmium and genome integrity. *Nat. Genet.* 34(3), 239-241.
- Mills, G. C.** (1957) Hemoglobincatabolism. I. Glutathione peroxidase, an enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J. Biol. Chem.* 229, 189-197.
- Mizjewski, G. J.** (1997) Alpha-fetoprotein as a biologic response modifier: relevance to domain and subdomain structure. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 15(4), 333-362.
- Mostert, V.** (2000) Selenoprotein P: properties, functions, and regulation. *Arch. Biochem. Biophys.* 376, 433-438.
- Muylle, F.,** Robbens, J., De Coen, W., Timmermans, J. P., Blust, R. (2006) Cadmium and zinc induction of ZnT-1 mRNA in an established carp cell line. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 143(2), 242-251.

- Mzimela, H. M.,** Wepener, V., Cyrus, D. P. (2003) Seasonal variation of selected metals in sediments, water and tissues of the groovy mullet, *Liza dumerelii* (Mugilidae) from the Mhlathuze Estuary, South Africa. Mar. Pollut. Bull. 46(5), 659-664.
- Novák, Z.,** Kovács, L., Pál, A., Pataki, L., Varga, Sz. I., Matkovics, B. (1990) Comparative study of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in cord maternal red blood cells. Acta Pediat. Hung. 30(3-4), 391-397.
- Ognjanović, B. I.,** Marković, S. D., Pavlović, S. Z., Zikić, R. V., Stajn, A. S., Saicić, Z. S. (2008) Effect of chronic cadmium exposure on antioxidant defense system in some tissues of rats: protective effect of selenium. Physiol. Res. 57(3), 403-411.
- Otsuka, F.,** Okugaito, I., Ohsawa, M., Iwamatsu, A., Suzuki, K., Koizumi, S. (2000) Novel responses of ZRF, a variant of human MTF-1, to in vivo treatment with heavy metals. Biochim. Biophys. Acta. 1492(2-3), 330-340.
- Palmiter, R. D.** (1994) Regulation of metallothionein genes by heavy metals appears to be mediated by a zinc-sensitive inhibitor interacts with a constitutively active transcription factor, MTF-1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91, 1219-1223.
- Pfeifer, H.,** Conrad, M., Roethlein, D., Kyriakopoulos, A., Brielmeier, M., Bornkamm, G. W., Behne, D. (2001) Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation. FASEB J. 15, 1236-1238.
- Pinto, R. E.,** Bartley, W. (1969) The effect of age and sex on glutathione reductase and glutathione peroxidase activities and on aerobic glutathione oxidation in rat liver homogenates. Biochem. J. 112(1), 109-115.
- Placer, Z. A.,** Cushman, L., Johnson, S. C. (1966) Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. Anal. Biochem. 16, 359-364.
- Pushpa-Rekha, T. R.,** Burdsall, A. L., Oleksa, L. M., Chisolm, G. M., Driscoll, D. M. (1995) Rat phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. cDNA cloning and identification of multiple transcription and translation start sites. J. Biol. Chem. 270, 26993-26999.
- Radtke, F.,** Georgiev, O., Müller, H. P., Brugnera, E., Schaffner, W. (1995) Functional domains of the heavy metal-responsive transcription regulator MTF-1. Nucleic. Acids. Res. 23(12), 2277-2286.

- Radtke, F.**, Heuchel, R., Georgiev, O., Hergersberg, M., Gariglio, M., Bembic, Z., Schaffner, W. (1993) Cloned transcription factor MTF-1 activates the mouse metallothionein I promoter. *EMBO J.* 12(4), 1355-1362.
- Rau, M. A.**, Whitaker, J., Freedman, J. H., Di Giulio, R. T. (2004) Differential susceptibility of fish and rat liver cells to oxidative stress and cytotoxicity upon exposure to prooxidants. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 137(4), 335-342.
- Renugadevi, J.**, Prabu, S. M. (2009) Naringenin protects against cadmium-induced oxidative renal dysfunction in rats. *Toxicol.* 256(1-2), 128-134.
- Rotruck, J. T.**, Pope, A. L., Ganther, H. E., Swanson, A. B., Hafeman, D. G., Hoekstra, W. G. (1973) Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science.* 179, 588-590.
- Roveri, A.**, Maiorino, M., Nisii, C., Ursini, F. (1994) Purification and characterization of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase from rat testis mitochondrial membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1208, 211-221.
- Samson, S. L.**, Gedamu, L. (1998) Molecular analyses of metallothionein gene regulation. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* 59, 257-288.
- Saydam, N.**, Adams, T. K., Steiner, F., Schaffner, W., Freedman, J. H. (2002) Regulation of metallothionein transcription by the metal-responsive transcription factor MTF-1: identification of signal transduction cascades that control metal-inducible transcription. *J. Biol. Chem.* 277(23), 20438-20445.
- Saydam, N.**, Georgiev, O., Nakano, M. Y., Greber, U. F., Schaffner, W. (2001) Nucleocytoplasmic trafficking of metal-regulatory transcription factor 1 is regulated by diverse stress signals. *J. Biol. Chem.* 276(27), 25487-25495.
- Schuckelt, R.**, Brigelius-Flohé, R., Maiorino, M., Roveri, A., Reumkens, J., Strabburger, W., Ursini, F., Wolf, B., Flohé, L. (1991) Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a seleno-enzyme distinct from the classical glutathione peroxidase as evident from cDNA and amino acid sequencing. *Free Rad. Res.* 14, 343-361.
- Sedlak, J.**, Lindsay, R. H. (1968) Estimation of total protein-bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* 25(1), 192-205.

- Smirnova, I. V.,** Bittel, D. C., Ravindra, R., Jiang, H., Andrews, G. K. (2000) Zinc and cadmium can promote rapid nuclear translocation of metal response element-binding transcription factor-1. *J. Biol. Chem.* 275(13), 9377-9384.
- Stapleton, S. R.** (2000) The selenium conundrum. *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 1823-1824.
- Stocks, J.,** Dormandy, T. L. (1972) The Autoxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. *Brit. J. Haemat.* 20(1), 95-111.
- Stoytcheva, Z. R.,** Berry, M. J. (2009) Transcriptional regulation of mammalian selenoprotein expression. *Biochim. Biophys. Acta.* 1790(11), 1429-1440.
- Suzuki, T. K.** (1992) Metallothionein: analysis in tissues and toxicological significance. *IARC Sci. Publ.* 118, 211-217.
- Takahashi, K.,** Akasaka, M., Yamamoto, Y., Kobayashi, C., Mizoguchi, J., Koyama, J. (1990) Primary structure of human plasma glutathione peroxidase deduced from cDNA sequences. *J. Biochem. (Tokyo)* 108, 145-148.
- Thimmalapura, R.,** Pushpa-Rekha, A. L., Burdsall, L. M., Oleksa, G. M., Driscoll, C., Driscoll, D. M. (1995) Rat Phospholipid-hydroperoxide Glutathione Peroxidase; cDNA cloning and identification of multiple transcription and translation start sites. *J. Biol. Chem.* 270, 26993-26999.
- Thisse, C.,** Degraeve, A., Kryukov, G. V., Gladyshev, V. N., Obrecht-Pflumio, S., Krol, A., Thisse, B., Lescure, A. (2003) Spatial and temporal expression patterns of selenoprotein genes during embryogenesis in zebrafish. *Gene Expr. Patterns.* 3, 525-532.
- Thompson, J. L.,** See, V. H. L., Thomas, P. M., Schuller, K. A. (2010) Cloning and characterization of two glutathione peroxidase cDNAs from southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*). *Comp. Bio. Chem. B.* Article in Press.
- Tietze, F.** (1969) Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. Applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* 27, 502-522.
- Toppo, S.,** Vanin, S., Bosello, V., Tosatto, S. C. (2008) Evolutionary and structural insights into the multifaceted glutathione peroxidase (Gpx) superfamily. *Antioxid. Redox. Signal.* 10(9), 1501-1514.

- Tosatto, S. C.,** Bosello, V., Fogolari, F., Mauri, P., Roveri, A., Toppo, S., Flohé, L., Ursini, F., Maiorino, M. (2008) The catalytic site of glutathione peroxidases. *Antioxid. Redox. Signal.* 10(9), 1515-1526.
- Toyama, M.,** Yamashita, M., Hirayama, N., Murooka, Y. (2002) Interactions of arsenic with human metallothionein-2. *J. Biochem.* 132(2), 217-221.
- Ursini, F.,** Maiorino, M., Gregolin, C. (1985) The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta.* 839, 62-70.
- Ursini, F.,** Maiorino, M., Valente, M., Ferri, L., Gregolin, C. (1982) Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochim. Biophys. Acta.* 710(2), 197-211.
- Utomo, A.,** Jiang, X., Furuta, S., Yun, J., Levin, D. S., Wang, Y. C., Desai, K. V., Green, J. E., Chen, P. L., Lee, W. H. (2004) Identification of a novel putative non-selenocysteine containing phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (NPGPx) essential for alleviating oxidative stress generated from polyunsaturated fatty acids in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 279(42), 43522-43229.
- Vinceti, M.,** Rovesti, S., Bergomi, M., Vivoli, G. (2000) The epidemiology of selenium and human cancer. *Tumori.* 86, 105-118.
- Virtamo, J.,** Valkeila, E., Alfthan, G., Punsar, S., Huttunen, J. K., Karvonen, M. J. (1985) Serum selenium and the risk of coronary heart disease and stroke. *Am. J. Epidemiol.* 122, 276-282.
- Waalkes, M. P.,** Poirier, L. A. (1984) In vitro cadmium-DNA interactions: cooperativity of cadmium binding and competitive antagonism by calcium, magnesium, and zinc. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 75(3), 539-546.
- Waisberg, M.,** Joseph, P., Hale, B., Beyersmann, D. (2003) Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology.* 192(2-3), 95-117. Review.
- Weiss Sachdev, S.,** Sunde, R. A. (2001) Selenium regulation of transcript abundance and translational efficiency of glutathione peroxidase-1 and -4 in rat liver. *Biochem. J.* 357, 851-858.
- Westin, G.,** Schaffner, W. (1988) A zinc-responsive factor interacts with a metal-regulated enhancer element (MRE) of the mouse metallothionein-I gene. *EMBO J.* 7(12), 3763-3770.

Wimmer, U., Wang, Y., Georgiev, O., Schaffner, W. (2005) Two major branches of anti-cadmium defense in the mouse: MTF-1/metallothioneins and glutathione. Nucl. Acids. Res. 33,(18) 5715-5727.

Yant, L. J., Ran, Q., Rao, L., Van Remmen, H., Shibata, T., Belter, J. G., Motta, L., Richardson, A., Prolla, T. A. (2003) The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults. Free. Radic. Biol. Med. 34(4), 496-502.

Zhang, Y., Liang, L., Jiang, P., Li, D., Lu, C., Sun, X. (2008) Genome evolution trend of common carp (*Cyprinus carpio* L.) as revealed by the analysis of microsatellite loci in a gynogenetic family. J. Genet. Genom. 35, 97–103.

9. ÖSSZEFOGLALÓ

Környezetünk, és ezen belül folyó-, és állóvizeink szennyezése napjainkban is visszatérő és jelentős problémája társadalmunknak, mely aktualitását fokozhatják egyes katasztrófa helyzetek, mint például a Tiszán végigsöprő 2000. évi cián- és nehézfém-szennyezés. A vizeinkben élő halak számára fokozott veszélyt jelent, hogy nem csak a táplálékkal együtt halmozhatják fel testükben az idegen anyagokat, de kopolyójukkal és bőrükkel állandó, szoros közelségben vannak a vízzel, és a vízben oldott anyagokkal.

A nehézfémek számos élettani folyamatot befolyásolhatnak; közvetlenül károsíthatják a sejt fehérjéit és az örökítő anyagát, másodlagos hatásként pedig reaktív oxigén szabadgyökök és intermedierek (ROS) képződését gerjeszthetik, melyek fokozott sejt-, és szövetkárosodást idézhetnek elő. A környezet stresszhatásaira adott gyors válaszadás képessége, illetve az annak során aktiválódó gének és fehérjék rendszere általános jellemzője az élőlényeknek, és nagyfokú homológiát mutat a baktériumoktól kezdve, egész az emlősökig.

Jelenlegi ismereteink szerint a nehézfém-kezelést követő stresszválasz legfőbb útvonalai; egyrészt a nagymennyiségű fémion megkötésére képes metallothioneinek (MT) és a transzkripciójukat elsődlegesen szabályzó *metal-responsive transcription factor* (MTF-1), másrészt a redukált glutation (GSH) és egyes enzimek, mint például a glutation peroxidázok (GPx), a glutation reduktáz (GR) és a glutation szintetáz (GSS). A kísérleteink során vizsgált *mtf-1*, *gpx1* és *gpx4* gének kulcsfontosságú tagjai ezen védekező rendszereknek. Expressziós mintázatuk és annak változásainak vizsgálata hozzájárulhat a stressz-válaszadás részletesebb megismeréséhez. Mivel kísérleteinket *in vivo*, kifejlett állatokon végeztük, így eredményeink valószínűleg jól közelítik a valós ökoszisztémákban bekövetkező változásokat.

A MT-ek fontos szerepet játszanak az esszenciális fémionok megkötésében, raktározásában és szállításában, azonban szerepük méginkább fokozódik, ha toxikus nehézfémek jutnak a szervezetbe. Mai ismereteink szerint a MT-ek denaturálódás nélkül képesek a Cd^{2+} és más fémionok megkötésére. A MT-ek expressziója elsődlegesen transzkripcionális úton szabályozódik, a folyamat egyik kulcsszereplője a Zn-függő MTF-1 faktor.

A kétértékű fém-ionok a szervezetben másodlagos hatásként szabadgyökök képződését indukálják. A GPx enzimek az antioxidáns védelmi rendszer nélkülözhetetlen elemei. Jelentős szerepet töltenek be a ROS káros hatásaival szembeni védekezésben, képesek a H₂O₂-t, egyes szerves lipidperoxidokat és koleszterol-észtereket redukálni, GSH oxidációja mellett. A foszfolipid hidroperoxid GPx-ok (GPx4) közvetlenül képesek a membránokhoz kapcsolódni, és meggátolni a gyökös láncreakciók iniciációját. Több halfajból azonosítottak már *gpx* géneket, azonban expressziójukról és indukálhatóságukról jelenleg is nagyon kevés adat ismert.

Munkacsoportunk fő célja minél több, a stressz-válaszadásban résztvevő géncsalád azonosítása halakban és szerepük vizsgálata a környezeti stresszhatásokkal szembeni védekezésben. A dolgozatomban szereplő kísérletek kezdetén célul tűztük ki az MTF-1 transzkripciós faktort és a GPx család két legismertebb tagját, a GPx1-t és GPx4-t, kódoló gének azonosítását pontyban.

Mivel az *mtf-1*, és a *gpx* gének esetében nem állt rendelkezésünkre szekvencia információ pontyból, ezért először a GenBank-ban található hal és emlős fajok szekvenciái alapján olyan primereket tervezzünk, melyek lehetővé tették a vizsgálni kívánt gének azonosítását, egy-egy hosszabb szakaszának felamplifikálását. A szekvenciák analízise alapján elmondhatjuk, hogy a legtöbb ismert hal és emlős fajhoz hasonlóan pontyban is csak egy *gpx1* gén azonosítható, annak ellenére, hogy a szintén a pontyfélék családjába tartozó zebradánió esetében két *gpx1* gént találtak. Emlősökben egy *gpx4* gén ismert, azonban pontyban, több más halfajhoz hasonlóan (zebradánió, aranyhal, lazac), két *gpx4* gént, a *gpx4a*-t és a *gpx4b*-t, azonosítottunk. Mindhárom ponty *gpx* gén esetében a fehérjét kódoló régió több mint 95 %-át meghatároztuk. Azonosítottunk két különböző *mtf-1* gént (*mtf-1.1* és *mtf-1.2*), illetve az egyik esetében egy *splice*-variáns jelenlétét is kimutattuk (*mtf-1.1a*). Az MTF-1.1 és az MTF-1.2 fehérje 98 %-os hasonlóságot mutat, kilenc pozícióban található aminosav-csere; kizárólag a transzaktivációs doménekben. Emiatt valószínűsíthető, hogy a két ponty MTF-1 fehérje más partnerekkel lép kölcsönhatásba. Ez az első példa, két *mtf-1* gén jelenlétére egy fajon belül. A ponty a *Cyprinidae* család számos tagjához hasonlóan több teljes illetve részleges genom- és gén-duplikáción esett át; egy természetes tetraploid faj. Az MTF-1.1a izoforma esetében az alternatív *splicing* során kialakult *frame shift* megváltoztatja a fehérje C-terminálisának aminosav-sorrendjét. A DNS-kötő

domének azonosak az MTF-1.1 fehérjével, így feltételezhető, hogy az izoforma képes kötődni az MTF-1 faktor target génjeinek promóteréhez. A transzaktivációs domének hiánya illetve módosulása miatt azonban az eredeti formájában nem képes ellátni a funkcióját. Mindegyik általunk azonosított gén igen nagy hasonlóságot mutat a pontyfélék családjába tartozó többi fajból (zebradánió, aranyhal, amur) ismert *gpx* és *mtf-1* gének szekvenciáival. A fehérjékben megtalálhatóak az egyes fehérjecsaládokra jellemző motívumok és kulcsfontosságú pozíciójú aminosavak.

Az azonosított szekvenciák alapján ponty-specifikus primereket terveztünk, melyek segítségével vizsgáltuk a gének expresszióját kezeletlen halak öt különböző szövetében; májban, vesében, szívben, izomban és agyban, illetve három izolált agyrégióban; a szaglőlebenyben, a középagyi régióban és a kisagyban.

A *gpx4* gének szövetspecifikus expressziója néhány embrionális eredmény kivételével korábban nem volt ismert halakban. Ponty májban magas *gpx4a* mRNS mennyiségeket mértünk. A *gpx4b* gén esetében a legmagasabb expressziót a szaglőlebenyben tapasztaltuk, míg a vesében és a kisagyban nem volt kimutatható. A *gpx1* gén expressziója májban, vesében és agyban ismert volt néhány halfajban, azonban a ponty *gpx1* expressziója lényeges eltérést mutat más fajok eredményeihez képest. A ponty *gpx1* legnagyobb mennyiségben a szívben expresszáldott, de vesében és a középagyi régióban is magas szinteket mértünk. Mind az aranyhalban, mind a fehér busában végzett kísérletek során a *gpx1*-nek elsősorban máj-specifikus expressziójáról számoltak be, agyban az aranyhal esetében nem volt detektálható mennyiségben jelen.

Az *mtf-1* gének korábbi vizsgálatait során Northern hibridizációval nem mutattak ki szövetspecifikus expressziót kezeletlen állatokban; sem halakban, sem emlősökben. Kísérleteink során mindhárom *mtf-1* mRNS-t az agyban tudtuk jelentős mennyiségben detektálni. Májban a legalacsonyabb *mtf-1.1* mRNS mennyiségeket mértük, az *mtf-1.1a* szint pedig a kimutathatósági határon mozgott. Az *mtf-1.2* mRNS kizárólag az agyban volt jelen kimutatható mennyiségben. Itt az *mtf-1.1/mtf-1.2* aránya közel három a kettőhöz volt. A vizsgált szövetekben az *mtf-1.1* expresszió volt a meghatározó.

Májban, a méregtelenítés egyik legfontosabb szervében, és agyban, mely a magas oxigéntartalma miatt egyik elsődleges célpontja a ROS károsító hatásainak, vizsgáltuk a gének expresszióját kétféle nehézfém-kezelést és egy fizikai stresszhatást követően.

10 mg/l-es Cd^{2+} - illetve As^{3+} -kezelésnek tettük ki a halakat 24-96 óra hosszan. A Cd^{2+} -kezelés hatására májban a *gpx1*, *gpx4a* és *mtf-1.1* gének expressziója mérsékelt módon emelkedett; az *mtf-1.2*, az *mtf-1.1a* és a *gpx4b* mRNS-ek azonban nem voltak kimutatható mennyiségben jelen. Az agyrégiókban minden vizsgált gén expressziója időfüggő csökkenést mutatott. Az As^{3+} -kezelés hatására bár kisebb mértékű, de hasonló tendenciájú változásokat láttunk mindkét szövetben; a *mtf-1.1a* splice-variáns kivételével. Az *mtf-1.1a* mRNS szintek a 48 órás As^{3+} -kezelést követően erős növekedést mutattak májban és agyban is. Az *mtf-1* és a *gpx4* gének transzkripcionális szintű szabályozására korábban nem volt példa az irodalomban. A *gpx1* expresszióját Cd^{2+} -kezelést követően egyedül aranyhal májban vizsgálták, azonban velünk ellentétben a *gpx1* mRNS szintek nagymértékű csökkenését tapasztalták már rövid idejű kezelést követően is.

A fizikai stresszhatások közül a hirtelen hőmérséklet-változást választottuk, mivel ez a stressz különösen jellemző az édesvízi halak életére. Emellett ismert, hogy a hidegkezelés sejtekre gyakorolt hatásai közelítik az oxidatív stresszt követő változásokat. 1 illetve 5 óráig tartó 7 °C-os hőmérsékletcsökkenésnek tettük ki a halakat, illetve ezt követően egy 1 órás időtartalomra visszahelyeztük őket az inkubációs hőmérsékletre; amivel tulajdonképpen egy hősokkot váltottunk ki. Az 5 órás kezelésekre az *mtf-1* gének, míg az 1 órás kezelésekre az *gpx1* gén mutatott indukciót. A *gpx4a* gén esetében mindkét szövetben csökkent mRNS szinteket detektáltunk. A közvetlenül a hidegsokk után, illetve a *recovery* periódust követően vett minták között nem találtunk különbséget az *mtf-1*, *gpx1* és *gpx4a* gének vizsgálata során. A *gpx4b* gén expressziója, mely a fémkezelések hatására minden esetben csökkent, közvetlenül a hidegsokkot követően májban 2,5-szeres indukciót mutatott, míg a *recovery* periódusokat követően a kontroll értékekhez hasonlított.

A stresszgének expressziója mellett, egy nagy dózisu Cd^{2+} -kezelést követően, vizsgáltuk a sejtkárosodásra utaló paraméterek és az antioxidáns védekező rendszer néhány kulcsenzimének aktivitás-változásait. A sejtkárosodás leggyakrabban vizsgált paraméterei közé tartozik a lipidperoxidáció, a DNS szál törések mértékének meghatározása, illetve a redukált és oxidált GSH szint változásainak követése. A korai időpontokban mindhárom paraméter változása sejtkárosodásra utalt; míg a 48 órás

kezelés után a lipidperoxidáció és a glutation szintek változásai a védőrendszerek hatásos aktivációját mutatták. Emellett, a GSH-homeosztázisban szerepet játszó enzimek, a GPx-ok és a GR, aktivitása is emelkedett.

Jelenlegi munkánk során is több olyan stresszgén azonosítását, és expressziójának vizsgálatát végezzük, melyek segítségével részletesebb képet nyerhetünk a környezeti stresszhatásokat követő válaszreakciókról.

10. SUMMARY

Environmental pollution, including the contamination of rivers and lakes, is still a persistent and significant problem. In some cases, it may be increased by disasters, such as the pollution of the River Tisza with cyanide and heavy metals in 2000. Fish are in great danger, because they accumulate harmful substances in their bodies via their food, and they are permanently exposed to dissolved substances through their gills and skins.

Almost all physiological processes are influenced by heavy metals. The proteins and nucleic acids are damaged and the formation of reactive oxygen species (ROS) is induced by metals, which may cause intense damage to the cells and tissues. The rapid response to environmental stress is a general characteristic of organisms, which (from bacteria to mammals) have a high degree of homology in the response of the cells.

One of the main pathways of stress responses is based on the metallothioneins (MTs) and their primary transcription regulator, metal-responsive transcription factor (MTF-1). Another pathway is associated with reduced glutathione (GSH) and certain enzymes, such as glutathione peroxidase (GPx), glutathione-S-transferase (GST), glutathione reductase (GR) and glutathione synthetase (GSS). It is clear, therefore, that the *mtf-1*, *gpx1* and *gpx4* genes are key members in the antioxidant defence system. Study of the expression patterns of these genes contributes to a better understanding of the stress response.

The MTs play important roles in the transport and storage of essential metal ions (Zn^{2+} and Cu^{2+}) in the organism, and their role increases when toxic heavy metals (Cd^{2+} , As^{3+} and Pb^{2+}) enter the organism. The expression of the MTs is primarily transcriptionally regulated and the Zn^{2+} -sensitive MTF-1 is a key factor in this process.

The formation of ROS is induced by metal ions as a secondary effect. The GPx enzymes protect against the harmful effects of ROS, because they reduce H_2O_2 , some organic lipid peroxides and cholesterol esters during the oxidation of GSH. The phospholipid hydroperoxide GPx (GPx4) binds directly to the membranes, and prevents the initiation of radical chain reactions. Eight different GPx families have been identified in mammals; in fish, only the classical GPx1 and GPx4 have been studied.

The main aims of our group are the identification and functional characterization of stress-response gene families in fish. At the beginning of these experiments, our primary aim was to identify genes coding for MTF-1, GPx1 and GPx4 in common carp. In order to design gene-specific primers for PCR amplification, databases were searched for *mtf-1* and *gpx* entries from fish and mammal species.

In the common carp, as in most fish, sequence analysis indicated a single *gpx1* gene, in contrast with the zebrafish (another member of the *Cyprinidae*), where two *gpx1* genes were found. In mammals, a *gpx4* gene has been identified, but in the common carp, as in other fish species (zebrafish, goldfish and salmon), two *gpx4*, *gpx4a* and *gpx4b*, have been isolated. More than 95% of the protein coding regions has been determined in all three *gpx* genes of carp.

Two different *mtf-1* genes (*mtf-1.1* and *mtf-1.2*) and the splice-variant of *mtf-1.1* (*mtf-1.1a*) have been identified in the common carp. The similarity of the MTF-1.1 and MTF-1.2 proteins is 98%; exchanges of nine amino acids are found in the transactivation domains. The two MTF-1 proteins of carp therefore probably interact with different partners. The common carp, like the other members of the *Cyprinidae*, demonstrates many genome and gene duplications; the common carp is a tetraploid species. In the case of MTF-1.1a, the isoform, the amino acid sequence of the C-terminal region is altered by a frame shift. The DNA-binding domains of MTF-1.1a are identical to those of the MTF-1.1 protein, but the acidic transactivation domain is modified and the proline- and serine/threonine-rich domains are missing. MTF-1 without the transcriptional activation domains retains its translocating and DNA-binding capacity, but is presumably unable to activate its target genes.

On the basis of the identified sequences, carp-specific primers were designed to study the expressions of *mtf-1* and *gpx* genes in five different tissues (liver, kidney, heart, muscle and brain) of untreated fish, and in three isolated brain regions (olfactory lobe, midbrain region and cerebellum).

The mRNA levels of *gpx4a* were expressed in all tissues of the carp, with the highest amount detected in the liver. A high expression of *gpx4b* was determined in the olfactory lobe, but in the kidney and cerebellum it was virtually undetected. The expressions of *gpx1* were known in the liver, kidney and brain of the goldfish and silver carp, but the expression of the *gpx1* gene of the carp differs significantly from those

of other fish. The carp *gpx1* was expressed with the highest level in the heart, kidney and midbrain regions. In other fish, the *gpx1* expression was liver-specific, and in the goldfish brain it was undetectable.

The tissue-specific expression of the *mtf-1* gene was undetectable by Northern hybridization in untreated fish and mammal species. All three *mtf-1* mRNAs of the common carp were detected in significant quantities in the brain. In the liver, the level of *mtf-1.1* mRNA was low and the level of *mtf-1.1a* mRNA was at the limit of detection. The *mtf-1.2* mRNA was virtually undetected in any organ but the brain. The *mtf-1.1:mtf-1.2* ratio in the brain was 3:2. In all tested tissues, the expression of *mtf-1.1* was the determining factor.

The liver is one of the most important organs of detoxification, and the brain has a high oxygen content, and is therefore the primary target of the harmful effects of ROS. The effects of two types of heavy metal treatments and physical stress were investigated.

The fish were treated with 10 mg/l Cd^{2+} and As^{3+} for 24-96 hours. The expressions of the *gpx1*, *gpx4a* and *mtf-1.1* genes were slightly increased after Cd^{2+} treatment in the liver, but the levels of *mtf-1.2*, *mtf-1.1a*, and *gpx4b* mRNA were virtually undetected. In the brain regions, time-dependent decreases were measured in the expressions of all tested genes. The As^{3+} treatment caused lower changes, but with similar tendencies in both tissues, except in case of *mtf-1.1a* splice-variant. After 48 hours of As^{3+} exposure, the mRNA levels of *mtf-1.1a* were increased in the liver and brain. There was a significant difference; the expression of the *gpx1* gene was undetected after Cd^{2+} treatment in these tissues of the goldfish.

Rapid changes in water temperature were chosen as a physical stress, because fish in a freshwater environment are subject to temperature fluctuations. Moreover, cold treatment causes an oxidative stress-like status in the tissues. The fish were exposed to a 1- or 5-h 7 °C temperature decrease and some fish were then allowed a 1-h recovery period to the temperature of incubation, which is basically a heat shock for them. The expressions of the *mtf-1* genes showed induction after the 5-h treatment, while those of the *gpx1* genes were increased after the 1-h treatment. The *gpx4a* mRNA level was decreased in both tissues. The induction of the *mtf-1*, *gpx1* and *gpx4a* genes did not differ after the direct cold shock and after the recovery period. The expression of the *gpx4b* gene, which was decreased by metal exposure, showed a 2.5-fold induction in the

liver immediately after hypothermia, while after the recovery period it was similar to the control value.

In addition to the expressions of the stress genes following high-dose Cd²⁺ treatment, other parameters of cell damage and the activities of some key antioxidant enzymes were investigated. The lipid peroxidation, the ratio of single- and double-stranded DNA and the changes in the reduced and oxidized GSH levels are the most frequently studied parameters of cell damage. In the early stages, damage to the cells was indicated by the changes in three parameters, but the repair systems were activated effectively after the 48-hour treatment. The activation of two enzymes of GSH homeostasis, GPx and GR, was induced.

The identification and expression analyses of several genes were continued in our current work, which will promote a better understanding of the stress reactions of fish after exposure to environmental effects.